



Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido

**MICROPROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE
PALMA FORRAGEIRA**

SELMA SILVA ROCHA

2020

SELMA SILVA ROCHA

**MICROPROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE
PALMA FORRAGEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador
Prof. Dr. Samy Pimenta

Janaúba
2020

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

Rocha, Selma Silva

R672m Micropropagação e diversidade genética em genótipos de palma forrageira [manuscrito] / Selma Silva Rocha. – 2019. 56 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros – Janaúba, 2019.

Orientador: Prof. D. Sc. Samy Pimenta.

1. Interação genótipo-ambiente. 2. Micropropagação. 3. Palma forrageira. I. Pimenta, Samy. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

CDD. 633.2

Catálogo: Joyce Aparecida Rodrigues de Castro Bibliotecária CRB6/2445

SELMA SILVA ROCHA

**MICROPROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE
PALMA FORRAGEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 12 de Dezembro de 2019.

Prof. Dr. Samy Pimenta
UNIMONTES (Orientador)

Dra. Luciana Cardoso Nogueira Londe
EPAMIG (Coorientador)

Prof. Dr. Wellington Silva Gomes
UNIMONTES (Conselheiro)

Me. Nívio Poubel Gonçalves
UNIMONTES (Conselheiro)

Dra. Suzane Ariadina de Souza
FAVAG (Conselheira)

**Janaúba
2019**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e á Nossa Senhora, por ter me dado forças e bênçãos ao longo dessa jornada;

À Universidade Estadual de Montes Claros, pela oportunidade de ensino gratuito e de qualidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudo;

Ao meu orientador, Professor Dr. Samy Pimenta pelos ensinamentos e apoio, que foram fundamentais para concluir esta etapa.

A minha coorientadora Dra. Luciana Cardoso Nogueira Londe, por me orientar durante toda graduação e mestrado, pelos grandes ensinamentos e suporte que foram essenciais nesta jornada;

A todos colegas do Laboratório de Biotecnologia da EPAMIG, pela amizade e apoio.

A todos do laboratório de Biologia Molecular da Unimontes, pelo auxílio e disponibilidade.

Aos membros da banca: o Professor Dr. Samy Pimenta, a pesquisadora Dr. Luciana Cardoso Nogueira Londe, o professor Dr. Wellington Silva Gomes, o pesquisador Nívio Poubel Gonçalves e a professora Dr. Suzane Ariadina de Souza, pelas contribuições e disponibilidade;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido.

À minha família, que sempre me apoiou e deu forças para persistir nos meus sonhos: à minha mãe (Ana Rosa) ao meu pai (João Duque), meus irmãos (Di, Nice, Toninho e Ré).

Aos meus sobrinhos, Luana, Alice e Luan.

Ao meu noivo Ranfley Vinícius, pelo apoio e companheirismo em todos os momentos.

Aos funcionários e servidores da UNIMONTES;

A todos os meus amigos;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	6
GENERAL ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
ARTIGO 1	13
PROPAGAÇÃO DE PALMA FORRAGEIRA SOB SISTEMAS DE MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	13
Resumo	14
Introdução	15
Material e métodos	17
Resultados e discussão.....	18
Conclusões	22
Agradecimentos.....	22
Referências bibliográficas.....	23
ARTIGO 2	31
CONGRUENCE BETWEEN MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR MARKERS FOR GENETIC DIVERSITY ANALYSIS APPLIED TO FORAGE PALM GENOTYPES PROPAGATED VIA BIOREACTORS	31
Abstract:.....	32
Introduction.....	34
Materials and methods.....	35
2.1 Morphological evaluation	36
2.2 Molecular evaluation	37
2.3 Joint analysis of morphological and molecular characteristics	39
Results and discussion	39
3.1 Morphological characterization in temporary immersion bioreactors.....	39
3.2 Molecular characterization based on RAPD markers.....	43
3.3 Comparison between dissimilarity methods	45
Conclusion	46
Acknowledgements	46
References.....	47
CONCLUSÕES GERAIS.....	56

RESUMO GERAL

ROCHA, Selma Silva. **Micropropagação e diversidade genética em genótipos de palma forrageira**. 2019. 56p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG ¹.

O plantio convencional da palma forrageira apresenta limitações que dificultam sua propagação e os programas de melhoramento. A aplicação das técnicas da cultura de tecidos por meio dos sistemas de multiplicação, semissólido (SS) e biorreatores de imersão temporária (BIT's) é uma alternativa eficiente para garantir a rápida multiplicação das plantas. Podendo estes também, contribuir com estudos de divergência genética. Objetivou-se com este estudo aplicar as técnicas da cultura de tecidos na propagação *in vitro* de onze genótipos de palma forrageira, avaliando a eficiência dos sistemas de multiplicação, semissólido e BIT's. E também avaliar o melhor sistema em estudos de divergência genética. Para avaliar eficiência dos sistemas de multiplicação, os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 11 x 2, por meio de delineamento inteiramente casualizado, sendo combinados onze genótipos de palma com dois métodos de micropropagação (Semissólido e BIT), totalizando 22 tratamentos com cinco repetições cada. Após 30 dias foram avaliados as seguintes variáveis: comprimento do cladódio (CM), diâmetro do cladódio (DM), massa fresca (MF) e massa seca (MS). Realizou-se a análise de variância conjunta ($p < 0,05$) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo agrupamento de médias de Scott-Knott ($p < 0,05$). Houve interação significativa entre os sistemas de multiplicação e os genótipos, para todas as características avaliadas, sendo o cultivo com biorreatores o mais responsivo. Observou-se que os genótipos respondem de forma distinta dependendo do gênero, espécie e ambiente de cultivo. Para realizar os estudos de divergência foi selecionado o sistema de multiplicação em BIT, devido às melhores respostas encontradas na propagação dos genótipos. Os dados fenotípicos expressos nesta fase foram utilizados como marcadores morfológicos. Para avaliar o potencial em estimar a dissimilaridade entre os genótipos, seu efeito foi comparado com marcadores moleculares do tipo RAPD. A dissimilaridade com base nos marcadores moleculares foi

¹**Comitê orientador:** Prof. Dr. Samy Pimenta – UNIMONTES (Orientador); Dr. Luciana Cardoso Nogueira Londe – EPAMIG (Coorientador); Dr. Wellington Silva Gomes – UNIMONTES (Conselheiro); Nívio Poubel Gonçalves – EPAMIG (Conselheiro); Dr. Suzane Ariadina de Souza – UNIMONTES (Conselheiro).

estimada pelo uso do Índice de Jaccard. As características morfológicas foram analisadas, individualmente, pelo teste de agrupamento Scott-Knott ($p < 0,05$) e conjuntamente, para a dissimilaridade, pela distância Euclidiana. Obteve-se dendrogramas individuais, para cada análise, utilizando ao método de UPGMA. Um tanglegrama foi gerado para ilustrar as semelhanças entre as associações dos dois dendrogramas. Com base na caracterização morfológica, foi possível a obtenção de dois grupos distintos. Observou-se semelhança morfológica entre pares de genótipos de diferentes gêneros. A investigação molecular permitiu diferenciar os genótipos em nível de gênero e espécie, discriminando aqueles considerados morfológicamente semelhantes. O comparativo entre os dados morfológicos e moleculares revelaram divergências e similaridades. Porém, foi possível através dos dados morfológicos obtidos via BIT's, quantificar o nível de divergência e similaridade entre os genótipos. De modo geral, o sistema de multiplicação via BIT's foi mais responsivo na propagação dos genótipos de palma forrageira e os dados fenotípicos expressos nesta fase de multiplicação, foram aplicáveis em estudos de divergência genética.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, *Opuntia*, *Nopalea*, marcadores moleculares.

GENERAL ABSTRACT

ROCHA, Selma Silva. Micropropagation and genetic diversity in forage palm genotypes. 2019. 56p. Dissertation (Master's Degree in Plant Production in the Semi-arid) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG².

Conventional forage palm planting has limitations that hinder its propagation and breeding programs. The application of tissue culture techniques through multiplication systems, semi-solid (SS) and temporary immersion bioreactors (BIT's) is an efficient alternative to ensure rapid plant multiplication. These may also contribute to genetic divergence studies. The objective of this study was to apply tissue culture techniques to the *in vitro* propagation of eleven forage palm genotypes, evaluating the efficiency of multiplication, semi-solid and BIT's systems. And also evaluate the best system in genetic divergence studies. To evaluate the efficiency of the multiplication systems, the treatments were arranged in an 11 x 2 factorial scheme through a completely randomized design, combining eleven palm genotypes with two micropropagation methods (Semisolid and BIT), totaling 22 treatments with five replications each. After 30 days the following variables were evaluated: cladode length (CM), cladode diameter (DM), fresh mass (MF) and dry mass (MS). Joint variance analysis ($p < 0.05$) was performed and, when significant, means were compared by the Scott-Knott grouping of means ($p < 0.05$). There was a significant interaction between the multiplication systems and genotypes for all traits evaluated, with the bioreactor culture being the most responsive. Genotypes respond differently depending on genus, species and growing environment. To perform the divergence studies, the BIT multiplication system was selected, due to the best responses found in genotype propagation. Phenotypic data expressed at this stage were used as morphological markers. To evaluate the potential for estimating dissimilarity between genotypes, its effect was compared with RAPD-type molecular markers. Dissimilarity based on molecular markers was estimated using the Jaccard Index. The morphological characteristics were analyzed individually by the Scott-Knott grouping test ($p < 0.05$) and together for dissimilarity by Euclidean distance. Individual dendrograms were obtained for each analysis using the UPGMA method. A

²**Guidance committee:** Prof. Dr. Samy Pimenta – UNIMONTES (Advisor); Dr. Luciana Cardoso Nogueira Londe – EPAMIG (Co-Advisor); Dr. Wellington Silva Gomes – UNIMONTES (Counselor); Me. Nivio Poubel Gonçalves – EPAMIG (Counselor) Dr. Suzane Ariadina de Souza – UNIMONTES (Counselor).

tanglegram was generated to illustrate the similarities between the associations of the two dendrograms. Based on the morphological characterization, it was possible to obtain two distinct groups. Morphological similarity was observed between pairs of genotypes of different genera. Molecular investigation allowed differentiating genotypes at genus and species level, discriminating those considered morphologically similar. The comparison between morphological and molecular data revealed divergences and similarities. However it was possible through the morphological data obtained via BIT's, to quantify the level of divergence and similarity between genotypes. In general, the BIT's multiplication system was more responsive in the propagation of forage palm genotypes and the phenotypic data expressed in this phase of multiplication were applicable in genetic divergence studies.

Keywords: *In vitro* cultivation, *Opuntia*, *Nopalea*, molecular markers.

INTRODUÇÃO GERAL

A palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) é uma cultura altamente eficiente quanto ao uso de água. Quando bem gerenciadas, estes gêneros podem produzir 50 a 60 vezes mais forragem por unidade de área do que as pastagens nativas em ambientes semiáridos (DUBEUX JR *et al.*, 2015). Por isso vem ganhando destaque em relação às demais forrageiras, mantendo sua produção mesmo frente às condições adversas do clima.

A multiplicação de palma forrageira acontece geralmente por meio de estaquia dos cladódios, porém apresenta crescimento lento, e a disponibilidade de mudas ocorre dois anos após o plantio, trazendo como consequência dificuldade na aquisição de propágulos vegetativos (PEIXOTO *et al.*, 2006). A propagação sexual por meio da multiplicação por sementes foi estudada como uma alternativa, entretanto, apresentou diversos problemas, como apomixia, o prolongamento da fase juvenil e o crescimento lento, quando comparada com a multiplicação assexuada (VILLALOBOS, 2001).

Tendo em vista os problemas relacionados à propagação convencional da palma forrageira, a cultura de tecidos tornou-se um importante instrumento visando à multiplicação das espécies vegetais. Essa técnica acelera os métodos convencionais de propagação vegetativa, fornecendo mudas de alto padrão, livre de pragas e, em curto espaço de tempo, em quantidade suficiente para a demanda (SCHIVINATO *et al.*, 2008).

O sucesso na tecnologia e aplicação dos métodos de cultura *in vitro* deve-se à melhor compreensão dos requerimentos nutricionais das células e tecidos em cultura. (FARIA *et al.*, 2002). Além da composição do meio de cultura e sua suplementação, é necessário que o sistema de multiplicação seja eficiente, para garantir o bom desenvolvimento da planta, destacando os sistemas de meio semissólido, líquido e os biorreatores. Esse último representa uma alternativa, para a micropropagação de plantas em escala comercial, com redução de mão de obra e ganhos na produtividade (PENCHEL *et al.*, 2007).

O método de plantio convencional, além de apresentar limitações na propagação da palma forrageira, trás dificuldades para programas de melhoramento, em fases de seleção. A propagação através dos cladódios e via sementes apresenta crescimento

lento, dificultando, assim, o processo de seleção na identificação de indivíduos superiores.

O processo de seleção em programas de melhoramento ocorre por meio do conhecimento da divergência genética existente entre os indivíduos. A quantificação da divergência pode ser feita através dos marcadores moleculares ou morfológicos (VIEIRA, 2005).

Por meio dos marcadores moleculares é possível acessar diretamente o genótipo de um indivíduo em nível de DNA, permitindo a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismo genético evitando a expressão do fenótipo e a influência ambiental (FALEIRO, 2007).

Os marcadores morfológicos são baseados em características fenotípicas das plantas de fácil visualização. Porém apresenta a desvantagem de serem identificados, em sua maioria, somente em planta inteira ou adulta, podendo ocasionar demora no processo de seleção (CATTANEO, 2015). Esse atraso é maior ainda em espécies que se demoram desenvolver como a palma forrageira.

Sabendo que os sistemas de multiplicação *in vitro* promovem rápida multiplicação das plantas, em tempo inferior ao requerido pelo método de plantio convencional. Torna-se interessante aplicar as técnicas da cultura de tecido, utilizando um dos sistemas de multiplicação *in vitro* para estudos de divergência genética. Tendo como vantagem a caracterização dos genótipos em fases iniciais.

A caracterização morfológica na fase de plântulas é de alta relevância em programas de melhoramento genético, pois fornece informações na fase inicial de desenvolvimento da planta. Essas informações podem auxiliar o melhorista na escolha de quais genótipos devem seguir no processo de melhoramento conforme o objetivo almejado (OLIVEIRA, 2019).

Sabendo das vantagens proporcionadas pela cultura de tecidos, é necessário avaliar eficiência do sistema de multiplicação *in vitro*, visando encontrar aquele que promove melhor desenvolvimento dos genótipos de palma forrageira e aperfeiçoar sua propagação *in vitro*. E a partir do conhecimento do melhor sistema de multiplicação, os dados fenotípicos expressos podem ser aplicados em estudos de divergência genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CATTANEO, L. F. Melhoramento genético do mamoeiro assistido por marcadores moleculares. In: MARTINS, D. dos S. (Ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória: Incaper, 2003. p. 191-208.
- DUBEUX JÚNIOR, J. C. B.; SANTOS, M. V. F. Exigências nutricionais da palma forrageira. In: MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E. V. S. (Ed.). **A palma do nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2005. v. 2, p. 105-128.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.
- FARIA, R. T.; SANTIAGO, D. C.; SARIDAKIS, D. P.; ALBINO, U. B.; ARAÚJO, R. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 489-492, 2002.
- OLIVEIRA, C. S.; PEIXOTO, J. V. M.; MOMESSO, M. P.; PEREIRA, L. M.; PERES, H. G.; MACIEL, G. M. Características de plântulas: dissimilaridade genética entre acessos de pimenta. **Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente**, Araras, v. 9, n. 1, p. 2-8, 2019. Disponível em: <http://www.revistacta.ufscar.br/index.php/revistacta/article/view/114/90>. Acesso em: 20 dez. 2019.
- PEIXOTO, M. J. A.; CARNEIRO, M. S. S.; SOUZA, P. Z.; DINIZ, J. D. N.; SOUTO, J. S.; CAMPOS, F. D. A. P. Desenvolvimento de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., em diferentes substratos, após micropropagação *in vitro*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 17-20, 2008. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/659>. Acesso em: 20 dez. 2019.
- PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação *in vitro*. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotechnology Florestal**, Viçosa: UFV, 2007. cap. 4. p. 75-92.
- SCHIAVINATO, Y. D. O, LUCCON, T. N., TOMBOLATO, A. F. C., BARBOSA, W. & VEIGA, R. D. A. Micropropagação de *Anthurium plowmannii* Croat. **Plant Cell Culture e Micropropagation**. Lavras, v. 4, n. 1, p. 15-20, 2008.
- VIEIRA, E. A.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; BENIN, G.; ZIMMER, P. D.; SILVA, J. A. G.; MARTINS, A. F.; BERTAN, I.; SILVA, G. O.; SCHMIDT, D. A. M. Comparação entre medidas de distância genealógica, morfológica e molecular em aveia em experimentos com e sem a aplicação de fungicida. **Bragantia**, v. 64, n. 1, p. 51-60, 2005.
- VILLALOBOS, V. M. A. Aplicação do cultivo de tecidos para a micropropagação de *Opuntia* sp. In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; PIMIENTA BARRIOS, E. (Ed.). **Agroecologia, cultivo e uso da palma forrageira**. SEBRAE: FAO, Paraíba, 2001. p. 72-74.

ARTIGO 1

**PROPAGAÇÃO DE PALMA FORRAGEIRA SOB SISTEMAS DE
MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO***
(Artigo formatado de acordo com as normas da Revista Australian Journal of
Crop Science-AJCS)

Propagação de palma forrageira sob sistemas de multiplicação *in vitro*

**Selma Silva Rocha^{1*}, Luciana Cardoso Nogueira Londe², Samy Pimenta³,
Maurício Mendes Cardoso⁴, Wellington Silva Gomes⁵, Jéssica Guerra Calaes⁶.**

¹Mestranda em Produção Vegetal no Semiárido, Unimontes, Campus Janaúba - MG, Brazil.

²Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional Epamig Norte de Minas, Nova Porteirinha- MG, Brazil.

³Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG, Brasil.

⁴Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional Epamig Norte de Minas, Nova Porteirinha- MG, Brazil.

⁵Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG, Brasil.

⁶Doutoranda em Produção Vegetal no Semiárido, Unimontes – Campus Janaúba - MG, Brazil.

***Autor correspondente: selmauniagro@gmail.com**

RESUMO

O sistema propagativo convencional da palma forrageira ainda apresenta limitações devido aos problemas fitotécnicos. A micropropagação é uma alternativa eficiente, pois aumenta a multiplicação das plantas garantindo rapidez e qualidade fitossanitária. O objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho na micropropagação de onze genótipos de palma forrageira em biorreator de imersão temporária e compará-lo com o cultivo convencional em meio semissólido. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 11 x 2 com delineamento inteiramente casualizado, sendo combinados onze genótipos de palma com dois métodos de micropropagação (Semissólido e BIT), totalizando 22 tratamentos com cinco repetições cada. Após 30 dias, foram avaliados as seguintes variáveis: comprimento do cladódio (CM), diâmetro do cladódio (DM), massa fresca (MF) e massa seca (MS). Realizou-se a análise de variância conjunta ($p < 0,05$) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo agrupamento de médias de Scott-Knott ($p < 0,05$). Foram estimados os coeficientes de correlação fenotípica, genotípica e de ambiente entre as variáveis consideradas. Houve interação significativa entre os sistemas de cultivo e os genótipos, para todas as características avaliadas, sendo o cultivo com biorreatores o mais responsivo. As respostas dos genótipos em ambos os

sistemas de cultivo foram distintas. Isto pode ser atribuído a diferentes fatores como, gênero e espécie e do ambiente de cultivo. Os estudos de correlação evidenciaram que, existe alta correlação fenotípica e genotípica entre diâmetro e massa seca em BIT. Em meio semissólido há correlação fenotípica e genotípica positiva entre comprimento e diâmetro. Os sistemas de multiplicação influenciam nas respostas dos genótipos, porém a eficiência de cada um depende do gênero e espécie cultivados.

Palavras-chave: Cactácea; BIT's, Semissólido, Micropropagação.

INTRODUÇÃO

A palma (*Opuntia* e *Nopalea*) é a cactácea forrageira mais cultivada no mundo, apresentando relevância social, econômica e ambiental para os sistemas produtivos (Zhou et al., 2016). O cultivo desta planta é reconhecido dentro dos programas de pesquisa pela importância na agricultura sustentável e nutrição animal. Por ser uma planta altamente eficiente quanto ao uso de água, a palma pode ser muito utilizada em regiões áridas e semiáridas uma vez que, a proporção é de aproximadamente 50:1, ou seja, 50 kg de água para cada quilograma de massa seca produzida (Silva et al., 2018). Além de apresentar altos teores de carboidratos totais (73,8% a 85,2%), carboidratos não fibrosos (42,3% a 65,0% e matéria mineral (8,1% a 17,7%) (Santos, 2018).

O potencial de utilização da palma forrageira vai muito além do seu uso na alimentação animal, podendo ser alavancada na produção de cosméticos, conservação e recuperação de solos e paisagismo, (Cândido Filho et al., 2014). Também vem ganhando destaque na alimentação humana (Albuquerque, 2018), e na área da saúde (Hernandez-Becerra et al., 2019).

As cactáceas podem ser multiplicadas por sementes ou propagação vegetativa via estacas ou brotos. A propagação vegetativa mais utilizada é realizada por meio do plantio de pequenas porções de cladódios, porém a disponibilidade de mudas só ocorre dois anos após o plantio (Estrada-Luna et al., 2008). A micropropagação *in vitro*, é uma alternativa à multiplicação das cactáceas. Dentre as vantagens desta técnica, tem-se o curto intervalo de tempo para produção de mudas, a necessidade de pequeno espaço físico e a obtenção de mudas livre de patógenos (Nogueira et al., 2017).

Por constituírem uma alternativa à conservação e à propagação convencional de espécies que, possuem crescimento lento e poucas brotações, as técnicas de cultivo *in vitro* vêm sendo cada vez mais aplicadas às diferentes espécies de cactáceas, relatadas com sucesso por diversos autores (Correia et al., 2011; Bárbara et al., 2015; Zingale, 2016). O benefício em sua utilização envolve diferentes fatores, tais como, a composição do meio de cultura, o ambiente de cultivo e o genótipo estudado (Santos, 2018).

Na micropropagação, as plantas propagadas são cultivadas *in vitro* com meios nutritivos adequados e em sistemas de multiplicação eficientes, podendo ser semissólido, líquido ou biorreatores (Almeida et al., 2015). O meio semissólido é constituído por agentes geleificantes, sendo que o mais utilizado é o ágar, um polissacarídeo que confere consistência ao meio e suporte às plantas (Quisen, 2008). Porém, na micropropagação de plantas, o custo de produção das mudas está fortemente associado aos reagentes químicos. Uma alternativa, para diminuí-lo está relacionada com a consistência do meio (Camolesi et al., 2010). O meio líquido é caracterizado pela ausência de agente geleificante (Pereira, 2003).

Os recentes avanços na biotecnologia e cultura de tecidos vegetal proporcionaram novos protocolos e equipamentos buscando minimizar os custos de produção, elevar a multiplicação de mudas *in vitro* e reduzir o tempo em laboratório. Entre esses equipamentos estão os biorreatores de imersão temporária (BIT's) (Londe et al., 2019). O uso de BIT's é uma ferramenta que proporciona maior sucesso na produção de mudas *in vitro* comparado ao método convencional (Camargo et al., 2019). Uma vez que, possui vantagens como: aceleração e aumento das taxas de multiplicação e produtividade, uniformidade de produção, redução de mão-de-obra e, conseqüentemente, custo total por unidade devido ao sistema automatizado e uso do meio líquido reduzindo custos com reagentes (Debiasi, 2011).

Logo, determinar qual sistema de cultivo promoverá melhor desenvolvimento e rápida multiplicação em genótipos de palma forrageira irá facilitar a propagação desta espécie, tendo em vista que os métodos convencionais de propagação não são suficientemente adequados para atender as exigências em termos de quantidade e qualidade fitossanitária. Esse trabalho foi desenvolvido com a finalidade de avaliar o desempenho de onze genótipos de palma forrageira propagados via biorreatores de imersão temporária e compará-lo com método convencional *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, EPAMIG Norte – Campo Experimental do Gortuba, Nova Porteirinha – MG, durante os anos de 2018 e 2019. A localização geográfica é definida pelas coordenadas 15°148'263 "de latitude sul e 43°17'650" de longitude oeste, a altitude média de 526 m.

Foram utilizados 11 genótipos de palma forrageira retirados do Campo experimental do Gortuba, sendo provenientes do banco de germoplasma do Instituto Agrônômico de Pernambuco-IPA (Tabela 1).

As plantas de palma forrageira utilizados no experimento foram obtidas a partir do estabelecimento *in vitro* de gemas de cladódios jovens em meio sólido MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de inositol, 4 mg L⁻¹ de BAP (Benzilamina-6-purina) e 7 g L⁻¹ de ágar com pH ajustado para 5,8. Este material permaneceu na sala de crescimento por 60 dias, ou até que se emitisse brotação, sob irradiância de 40 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por luz branca fria, com 16 horas de fotoperíodo a 25±2°C. A brotação originada foi subcultivada em meio de cultura de mesma composição durante 90 dias, atingindo o terceiro subcultivo.

No cultivo *in vitro* foram utilizados dois métodos, o convencional utilizando o meio de cultura sólido (7g L⁻¹ de ágar) e o biorreator de imersão temporária utilizando o meio líquido.

Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 11 x 2 com delineamento inteiramente casualizado, sendo combinados onze genótipos de palma forrageira com os dois métodos de micropropagação, totalizando 22 tratamentos com cinco repetições e cada repetição foi composta por quatro explantes.

Os explantes tiveram seu comprimento reduzido para 15 mm (±1 mm) e foram em seguida acondicionados em biorreatores de imersão temporária e em frascos de subcultivo convencional.

Na micropropagação convencional, foram utilizados frascos 50 ml com meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de inositol, 7 g L⁻¹ de ágar, 0,5 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftaleno-acético) e 1 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina).

No biorreator de imersão temporária (BIT`s) foi utilizado meio de cultura com composição semelhante, porém sem adição do agente geleificante. Sendo acrescentado 200 mg L⁻¹ de ácido ascórbico e 0,25 ml de PPM (Plant Preservative Mixture Sigma).

Os explantes permaneceram em contato com o meio líquido por três minutos a cada hora (Londe et al., 2019). Em ambos os métodos o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 120°C e kg cm^{-1} por 20 minutos.

Os tratamentos permaneceram em sala de crescimento submetidos à fotoperíodo de 16 horas obtidos a partir de lâmpadas LED branca ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura média de 25°C por um período de 30 dias. Finalizado este período foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento do cladódio (cm), diâmetro médio do cladódio (mm), massa da matéria fresca e seca (g).

As variáveis foram submetidas ao teste de normalidade de Lilliefors e ao teste de Bartlett para verificação da normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias, respectivamente. As variáveis, massa fresca e seca foram transformadas com uso da função $Y = (\sqrt{x}+1)$ em razão da ausência de normalidade. Após a confirmação das exigências para uma análise de variância individual e conjunta, esta foi realizada a uma probabilidade de 5% de erro. Os sistemas de micropropagação foram comparados pelo teste F ($p < 0,05$) e os genótipos pelo agrupamento de médias de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Foram estimados os coeficientes de correlação fenotípica (r_p), genotípicas (r_g) e ambiental (r_e). As magnitudes dos coeficientes de correlação foram classificadas como: 0,00 a 0,19 (muito fraca) 0,20 a 0,39 (fraca) 0,40 a 0,69 (moderada) 0,70 a 0,89 (forte) 0,90 a 1,00 (muito forte) (Shimakura e Ribeiro Junior, 2006). Utilizou-se o teste t para verificar o nível de significância das correlações. Todas as análises foram obtidas com o auxílio do software Genes (Cruz, 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se a interação entre os fatores genótipos e sistemas de multiplicação (SM) para todas as características avaliadas (Tabela 2). Ao analisar o desdobramento do sistema de multiplicação em cada genótipo, nota-se que o biorreator proporcionou melhores médias para as características comprimento do cladódio, diâmetro, massa seca e fresca em todos os genótipos avaliados (Tabela 3). É provável que esse resultado seja em razão do aumento da disponibilidade de água e nutrientes proporcionados por esse meio de cultivo (Chen e Ziv, 2001). No qual não existe resistência física para a difusão dos nutrientes, quando comparado aos meios de cultura de consistência semissólida.

A eficiência do biorreator de imersão temporária sobre o sistema semissólido é explicada pelo seu sistema automatizado, que controla o contato dos explantes com o

meio líquido (Georgiev et al., 2014). Isto provoca a renovação da atmosfera do recipiente de cultivo, possibilitando a remoção dos gases eliminados pelas plantas, os quais podem ter efeito inibidor ao seu crescimento (Rech, 2004).

Ao analisar o desdobramento dos genótipos em cada sistema de multiplicação nota-se que os genótipos não diferiram entre si para a característica comprimento do cladódio, ao se utilizar o sistema semissólido. Para as demais características os genótipos IPA 100001, IPA 200002, IPA 100414 obtiveram melhor desempenho (Tabela 3).

Para os genótipos cultivados em BIT`s estes diferiram entre si em todas as características consideradas, sobressaindo os genótipos IPA 100001, IPA 100414, IPA 100412, IPA 200173, IPA 200174 e IPA 200002. A maioria dos genótipos revelou individualidades sobre as mesmas condições. Provavelmente, por serem materiais de gêneros e espécies distintas. Londe et al. (2019), trabalhando com os genótipos IPA 200016 do gênero *Opuntia* com os do gênero *Nopalea* o IPA 100004 e o IPA 200205, observaram que estes obtiveram diferentes respostas morfogenéticas no sistema de multiplicação em BIT`s.

Percebe-se também que, um mesmo genótipo pode apresentar comportamento diferente dependendo do ambiente e meio de cultivo em que é cultivado. Pois, um ambiente pode fornecer melhores condições para desenvolvimento que o outro, associado às exigências específicas de cada genótipo. Um dos fatores que podem influenciar no desempenho distinto dos genótipos é a consistência do meio de cultura. No meio semissólido é utilizado o ágar, que apesar de proporcionar sustentação para o explante, reduz a disponibilidade de água, nutrientes e reguladores de crescimento para as plantas (Pereira-Neto et al., 2007).

No BIT`s é utilizado o meio líquido, que fornece maiores taxas de absorção de nutrientes. Isto ocorre devido a maior área de contato entre o meio e a superfície do explantes (Roels et al., 2005). Propiciando uma melhor oxigenação das plantas, qualidade dos propágulos e, conseqüente, sobrevivência durante a aclimatização (Murch et al., 2004). Porém, a utilização de meios líquidos ou com baixas concentrações do solidificante ágar pode levar à vitrificação dos cultivos, influenciando negativamente a morfogênese *in vitro* (Chen e Ziv, 2001). Neste trabalho não foi observado vitrificação dos explantes em BIT`s.

Em regra, é necessário um ajuste de protocolo para cada espécie, cultivar ou genótipo em particular. Conforme Fortes e Pereira (2001), espécies e cultivares

necessitam de protocolos específicos, já que, de acordo com as características genéticas, cada um pode apresentar resultados diferentes sob a mesma condição de cultivo.

De um modo geral os genótipos do gênero *Opuntia* são mais responsivos em BIT`s. Enquanto que os do gênero *Nopalea* apresentam melhor desenvolvimento em meio semissólido. Apesar de que, em ambos os sistemas de cultivo, os genótipos do gênero *Nopalea* obtiveram menor desenvolvimento comparada com os do gênero *Opuntia*. Isto porque, as cultivares do gênero *Nopalea*, normalmente apresentam menor estatura quando comparadas com as do gênero *Opuntia* (Marques et al., 2017).

Em meio semissólido não houve diferença significativa para comprimento de cladódios em todos os genótipos considerados. Isto pode estar relacionado à velocidade de difusão dos nutrientes. Em meio semissólido os nutrientes são fornecidos pelas plantas de forma lenta. Enquanto no meio líquido a taxa de assimilação dos nutrientes ocorre de forma mais rápida (Ziv, 1995).

Em biorreator, os genótipos IPA 100001 e IPA 200002 obtiveram maior comprimento do cladódio (Tabela 3). A cultivar gigante (IPA 100001) apresenta grande porte, cladódios largos e de maior peso, sendo mais produtiva em condições de campo (Vasconcelos, 2009). O IPA 20002 é um genótipo com características morfológicas similares ao IPA 100001. (Santos, 2008). Apesar da rápida absorção dos nutrientes fornecidos pelo meio líquido, a capacidade dos genótipos em responder a este estímulo irá depender também das características das espécies.

Observaram-se diferenças significativas quanto às respostas dos genótipos em nível de espécie (Tabela 3). Dentro do gênero *Opuntia*, os genótipos IPA 100414, IPA 200173, IPA 100412, IPA 100410, IPA 100002 pertencentes às espécies *Opuntia ficus-indica*, e IPA 200174 (*Opuntia Undulata Griffiths*) alcançaram maior diâmetro, massa fresca e seca quando micropropagados em BIT`s, enquanto que o IPA 200016 (*Opuntia Stricta Haw*) foi responsivo em meio semissólido.

Verifica-se também que os genótipos podem apresentar o mesmo desempenho em ambientes diferentes. Fato observado pelos genótipos IPA 200002 e IPA 100001 que sobressaíram nos dois sistemas de multiplicação. Isto significa que, os dois sistemas de multiplicação considerados, podem ser recomendados para propagação desses genótipos.

Além de determinar o melhor sistema de multiplicação, é necessário entender as relações existentes entre variáveis. Isto porque a obtenção de ganhos genéticos e a definição dos melhores genótipos são, muitas vezes, dirigidas a um conjunto de

variáveis agronômicas e comerciais (Ferreira, 2007). A própria aplicação e indicação de um determinado sistema de cultivo *in vitro* pode ser melhor apresentado quando se faz uma abordagem considerando todas as variáveis simultaneamente, ou a relação destas aos pares.

As estimativas dos coeficientes de correlação fenotípica, genotípica e de ambiente, entre pares de caracteres são importantes, principalmente quando a seleção de um caráter desejável apresenta dificuldades, seja por baixa herdabilidade e/ou por problemas de medição e identificação, permitindo obter ganhos em uma delas, através da seleção indireta em outra característica (Cruz e Regazzi, 2012). Estudos de correlação são úteis em experimentos com palma forrageira, principalmente no tocante a identificação da contribuição genética na manifestação de uma determinada característica.

No sistema de multiplicação em biorreator, notam-se correlações fenotípicas significativas entre os pares, DM x MF, DM x MS e MF x MS (Tabela 4), com baixo efeito residual. Pela seleção indireta da variável diâmetro do cladódio, têm-se maior acúmulo de massa fresca e seca. Na prática esse resultado direciona ensaios para possibilidade de reduzir o número de variáveis analisadas, o que pode reduzir tempo e recurso na execução de experimentos, como esse aqui realizado.

Correlações fenotípicas significativas foram observadas no sistema de multiplicação semissólido para todas as combinações (Tabela 4). Infere-se que a variável comprimento ou diâmetro do cladódio podem ser indicadas para ganhos de massa fresca e seca. Isto na prática é uma tática facilitadora quando um caráter de elevado valor econômico e difícil de avaliar quando comparado a outro caráter associado a ele (Ferreira et al., 2012). A seleção indireta pode ser uma estratégia a ser usada em palma forrageira, por exemplo, para avaliar comprimento da planta via diâmetro, que é mais facilmente mensurada.

Todas as correlações genéticas e ambientais foram não significativas (Tabela 4). Apesar da ausência de significância, em valores absolutos e pela classificação aqui considerada para este parâmetro, verifica-se que a maioria destas foi alta e positiva. Silva et al., (2010), avaliando a relação entre caracteres morfológicos e produtivos de 50 clones de palma forrageira, observaram que as características altura da planta associada a largura apresentam alta correlação com a produção. Tal fato ocorre porque a causa da correlação genética é, principalmente, a pleiotropia, fenômeno pelo qual um gene influencia dois ou mais caracteres. Isto significa que se dois caracteres apresentam

correlação genética favorável, é possível obter ganhos para um deles por meio da seleção indireta no outro associado (Cruz et al., 2004).

Em ambos os sistemas de multiplicação as variáveis indicadas estão relacionadas com a produção de massa seca e fresca. Torna-se assim, importante adquirir o conhecimento dos efeitos e da correlação em que há, entre a produtividade e morfologia, para a identificação dos fatores que atuam na produção (Silva et al., 2010). As duas variáveis correlacionadas com a biomassa, além de contribuírem nos estudos de palma forrageira, levam à redução de um grande número de caracteres a serem avaliados, muitos deles difíceis de serem avaliados devido à arquitetura da planta.

CONCLUSÕES

Ambos os sistemas de cultivo influenciam nas respostas morfogenéticas dos genótipos avaliados. Porém, estes apresentam individualidades dependendo do gênero e espécie.

Os genótipos do gênero *Opuntia* apresentam maior diâmetro, massa fresca e seca em BIT`s, comparado ao meio semissólido.

No meio semissólido os genótipos do gênero *Nopalea* se desenvolvem melhor, quando comparado ao BIT.

De acordo com o estudo das correlações, a seleção indireta da característica comprimento e diâmetro do cladódio resulta em maior acúmulo de massa fresca e seca, no sistema de multiplicação semissólido e em BIT`s.

Analisando o conjunto de informações deste estudo, recomenda-se o uso dos BIT`s, como sistema propagativo da palma forrageira, tendo em vista melhores respostas observadas nos genótipos, facilidade de manuseio e baixo custo no processo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque JG, Souza AJ, Albuquerque JG, Farias TGS, Escalona-Buendía HB, Bosquez-Molina E, Azoubel PM (2018) Consumer perception and use of nopal (*Opuntia ficus-indica*): a cross-cultural study between Mexico and Brazil. *Food Res Int.* 124:101-108
- Bárbara EPS, Silva AA, Souza MMOR, Gurgel, ZER, Marchi, MNG, Bellintani, MC (2015) Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia. *Gaia Scientia.* 9(2):91-96.
- Batista ACS, Cunha DNFV, Gomes ES, Oliveira LP, Silva, GM, Macedo, LFM, Martuscello JA (2011) Cultivo de Palma Forrageira cultivar Miúda em sistema adensado e super adensado de plantio. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 21., Anais. Maceió: ABZ.
- Camargo SS, Rufato L, Magro M, Souza AL (2019) Biorreatores de imersão temporária: técnica eficiente para a propagação de morangueiro de Pircinque. *Rev Bras Frutic.* 41(1):1-8.
- Camolesi MR, Faria RT, Neves CSVJ, Martins, AN (2010) Volume do frasco e consistência do meio de cultura na multiplicação *in vitro* da bananeira ‘Maçã’. *Ciência Rural*, 40:255-260.
- Cândido Filho A, Pereira F, Lima A (2014) Base alimentar humana com o uso da palma forrageira. VI Simpósio de Reforma Agrária e Questões Rurais. Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco.
- Chen J, Ziv M (2001) The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-culture *Narcissus*. *Plant Cell Reports*, 20:22-27.
- Correia D, Nascimento EHS, Araújo JDM, Anselmo GC, Coelho PJA (2011) Germinação de sementes de cactáceas *in vitro*. Brasília, DF: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. Comunicado Técnico 6.
- Cruz CD (2016) Genes Software: extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum*, 38(4):547-552.

- Cruz CD, Regazzi AJ, Carneiro PCS (2012) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, MG: UFV, 2012. v. 1. 514.
- Cruz CD, Regazzi AJ, Carneiro PCS (2014) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, MG: UFV, 2014. v. 1. 480.
- Debiasi C (2011) Utilização de biorreatores de imersão temporária em uma biofábrica de cultura de tecidos. In: Gerald LTS (Org.) Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*. São Paulo: Antiqua, p. 99-115.
- Dubeux JR JCB et al. (2006) Productivity of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller under different N and P fertilization and plant population in north-east Brazil. *J Arid Environ* 67(3):357-372.
- El Finti, Aissam, Rachida EL, Boullani I, AIT Naima, Fouad MSANDA, Mohammed AS, Abdelhamid EL, Mousadik (2013) Propagação *in vitro* de três cactos *Opuntia* e estabelecimento de plantas no solo. *Notulae Scientia Biologica* 5(1):39-44.
- Estrada-Luna AA, Martínez-Hernández JJ, Torres-Torres ME, Chablé-Moreno F. (2008). *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to *ex vitro* conditions. *Sci Hortic* 117:378-385.
- Farias I, Santos DC, Dubeux Junior JCB (2005) Estabelecimento e manejo da palma forrageira. In: Menezes RSC, Simões DA, Sampaio EVSB (Eds.) *A palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso*. Recife-PE: Editora Universitária da UFPE, p. 81-103.
- Ferreira FM, Barros WS, Silva FL, Barbosa MHP, Cruz CD, Bastos IT (2007) Relações fenotípicas e genotípicas entre componentes de produção em cana-de-açúcar. *Bragantia*, 66(4):605-610.
- Ferreira JP, Schmildt O, Schmildt ER, Piantavinha WC, Cattaneo LF (2012) Correlações entre características morfo-agronômicas de acessos de mamoeiro. *Enciclopédia Biosfera*, 8(14):246-257.
- Georgie V, Schumann A, Pavlov A, Bley (2014) T. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in life sciences*, 14(6):607-621.

Hernandez-Becerra E, et al (2019) Effect of Nopal (*Opuntia ficus indica*) Consumption at Different Maturity Stages as an Only Calcium Source on Bone Mineral Metabolism in Growing Rats. Biol Trace Element Res, 1-9.

Londe LCN, Viana WS, Rocha SS, Araújo PGM, Calaes JG, Pereira JCG, Gonçalves NP (2019) Use of temporary immersion bioreactors on *in vitro* culture of cactus pear African J Agric Research, 14(32):1487-1492.

Mohamed-Yasseen Y, Barringer SA, Splittstoesser WE (1995) Micropropagation of the endangered succulent, *Stapelia semota* by axillary proliferation. Cactus Succul J, 67(6):366-368.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-497.

Murch SJ, Peiris SE, Liu CZ, Saxena PK (2004) *In vitro* conservation and propagation of medicinal plants. Biodiversity, 5(2):19-24.

Nogueira JS, Costa FHS, Vale PAA, Luis ZG, Scherwinski-Pereira JE (2017) Micropropagação de bambu em larga escala: princípios, estratégias e desafios. In: Drumond, PM, Wiedman, G. (Org.). Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia. Rio de Janeiro: Instituto Ciência Hoje, 2017.

Pereira J, Medeiros CAB, Fortes GRL, Pereira AS, Daniels J (2001) Avaliação de dois sistemas hidropônicos na produção de material pré-básico de batata. Horticult Bras 19 Suplemento CD-ROM.

Pereira JES, Fortes GRL (2003). Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. Pesq Agropec Bras 38(9):1035-1043.

Pereira-Neto AB, Petkowicz, CL, Cruz-Silva CT, Gazzoni MT, Mello AF, Silveira JL (2007) Differential performance of marubakaido apple rootstock shoots grown in culture media containing different agar brands: dynamic rheological analysis. In: Vitro Cellular Developmental Biology Plant 43:356-363.

Quisen RC, Ângelo PCS (2008) Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, Documentos, 61. 44.

Ramalho MAP, Santos JB, Zimmermann MJ (1993) Genética quantitativa em plantas autógamias. Goiânia: UFG, 1993. 272.

Rech Filho A (2004) Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de Bromélias. Dissertação-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

Ribeiro JM, Nataniel MF, Coelho AKNS, Pinto MST (2013) Uso da rapadura como meio nutritivo para cultivo in vitro de bananeira cv. Maçã. Rev Ceres 60(5):722-725.

Roels S, Escalona M, Cejas I, Noceda C, Rodriguez R, Canal MJ, Sandoval J, Debergh P (2005) Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 82(1):57-66.

Santos DC, Farias I, Lira MA, Santos MVF, Arruda GP, Coelho RSB, Dias FM, Melo JN (2006) Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco. Recife: Instituto Agrônomico de Pernambuco, 2006 Documentos, 30. 48.

Santos MA, Santos BRC (2018) Silagem da palma forrageira consorciada com resíduos da mandioca e bagaço da cana-de-açúcar: PUBVET, 12(11):1-8.

Shimakura SE, Ribeiro Júnior PJ (2006) Estatística descritiva: interpretação do coeficiente de correlação. Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná, 2006.

Silva NGM, Lira MA, Santos, MVF, Dubeux Júnior, JCB, Mello ACL, Silva MC (2010) Relação entre características morfológicas e produtivas de clones de palma-forrageira. Rev Bras Zootecnia 39(11):2389-2397.

Silva RC, Ferreira MA, Oliveira JCV, Santos DC, Gama MAS, Chagas JCC, Pereira L GR (2018) Orelha de Elefante Mexicana (*Opuntia stricta* [Haw.] Haw.) spineless cactus as an option in crossbred dairy cattle diet. South African Journal Animal Science, 48(3):516-525.

Vasconcelos AGV, Lira MA, Cavalcanti VALB, Santos MVF (2009) Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha do carmim (*Dactylopius sp*) Rev Bras Zootecnia 38(5):827-831.

Vencovsky R, Barriga P (1992) Associação entre caracteres. In: Vencovsky R, Barriga P Genética biométrica no fitomelhoramento. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 335-486.

Zhou Z, Andersen MN, Plauborg F (2016) Radiation interception and radiation use efficiency of potato affected by different N fertigation and irrigation regimes. European Journal Agronomy, 81:129-137.

Zingale N (2016) Tecniche innovative di propagazione e di caratterizzazione di specie e varietà di Opuntia e generi affini. Dottorato (Produttività delle piante coltivate in ambiente mediterraneo) Università degli Studi di Catania, Itália, 135.

Tabela 1. Identificação dos genótipos de palma forrageira utilizados no experimento. Nova Porteirinha/MG. 2018.

Gênero	Genótipos	Espécies	Nº no BAG
	Orelha de elefante mexicana	<i>Opuntia stricta</i> Haw	IPA-200016
	Orelha de elefante africana	<i>Opuntia undulata</i> Griffiths	IPA-200174
	Redonda	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-100002
	IPA 90-156	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-100414
<i>Opuntia</i>	Gigante	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-100001
	Marmillon Fodder - (1327)	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-200173
	IPA 90-111	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-100412
	COPENA-V1	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-200002
	IPA-90-92	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-100410
<i>Nopalea</i>	Miúda	<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm-Dyck	IPA-100004
	IPA Sertânia	<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm-Dyck	IPA-200205

Tabela 2. Resumo da análise de variância para as características: comprimento do cladódio (CM), diâmetro médio (DM), massa fresca (MF) e massa seca (MS) aos 30 dias de avaliação. Nova Porteirinha-MG. EPAMIG, 2019.

FV	GL	CM	DM	MF	MS
Genótipos (G)	10	78,0 ^{ns}	11,5 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0.0002 ^{ns}
Sistemas de multiplicação (SM)	1	21169,72 ^{**}	144,8 ^{**}	0,16 ^{**}	0.0013 ^{**}
GxSM	10	55,5 ^{**}	4,9 ^{**}	0,03 ^{**}	0.0001 ^{**}
Resíduo	418	4,6	0,5	0.002	0.00001
CV(%)		24,12	17,16	4,03	1,35

^{**},e ^{ns}:significativo a 0,05 e não significativo, respectivamente.

Tabela 3. Influência do sistema de multiplicação semissólido (SS) e biorreator de imersão temporária (BIT), sobre o comprimento de cladódio, diâmetro, massa fresca e seca em genótipos de palma forrageira, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Nova Porteirinha/MG. 2019.

GENÓTIPOS	COMPRIMENTO (cm)		DIÂMETRO (cm)		MASSA FRESCA (g)		MASSA SECA (g)	
	SS	BIT	SS	BIT	SS	BIT	SS	BIT
IPA 200016	1,93 Ba	15,61 Ac	3,26 Bc	3,73 Ad	1,14 Bb	1,42 Ac	1,12 Bb	1,04 Ad
IPA 200205	1,95 Ba	17,14 Ab	2,77 Bc	3,63 Ad	1,09 Bc	1,39 Ad	1,00 Bc	1,05 Ad
IPA 100001	2,24 Ba	18,31 Aa	4,97 Ba	5,57 Aa	1,18 Ba	1,90 Aa	1,16 Ba	1,26 Aa
IPA 100414	2,07 Ba	16,84 Ab	4,53 Bb	5,24 Aa	1,20 Ba	1,96 Aa	1,15 Ba	1,20 Aa
IPA 200174	1,37 Ba	16,76 Ab	4,54 Ac	4,45 Aa	1,05 Bd	1,99 Aa	1,00 Bc	1,27 Aa
IPA 100004	1,49 Ba	11,20 Ad	3,35 Bc	3,89 Ad	1,04 Bd	1,30 Ad	1,00 Bc	1,10 Ac
IPA 100002	2,05 Ba	14,71 Ac	3,81 Bc	5,18 Aa	1,06 Bb	1,86 Aa	1,00 Bc	1,16 Ab
IPA 200173	1,63 Ba	13,85 Ac	3,97 Bc	4,60 Aa	1,10 Bc	1,92 Aa	1,00 Bc	1,20 Aa
IPA 100412	1,65 Ba	12,68 Ad	3,80 Bc	4,63 Aa	1,11 Bc	1,71 Ab	1,00 Bc	1,20 Aa
IPA 100410	2,57 Ba	17,11 Ab	3,83 Bb	5,22 Aa	1,05 Bd	1,90 Aa	1,00 Bc	1,16 Ab
IPA 200002	2,63 Ba	19,97 Aa	4,31 Ba	6,66 Aa	1,19 Ba	1,92 Aa	1,15 Ba	1,23 Aa
CV (%)	24,12		17,16		4,03		1,35	

Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Coeficientes de correlação fenotípica (rf), genotípica (rg) e ambiental (re) entre caracteres morfológicos avaliados em onze genótipos de palma forrageira. Nova Porteirinha/MG. 2019.

Variáveis	rf		rg		re	
	SS	BIT	SS	BIT	SS	BIT
CM x DM	0,85**	0,013	0,90	0,016	0,63	-0,27
CM x MF	0,86**	0,20	0,88	0,20	0,46	0,30
CM x MS	0,71*	0,12	0,73	0,13	0,30	0,67
DM x MF	0,92**	0,87**	0,95	0,92	0,38	0,32
DM x MS	0,80**	0,83**	0,84	0,90	0,25	0,14
MF x MS	0,66*	0,96**	0,66	1,00	0,64	0,47

** e *: significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste t.

CM= Comprimento do cladódio; DM= diâmetro médio do cladódio; MF= massa da matéria fresca; MS= Massa da matéria seca.

ARTIGO 2

**CONGRUENCE BETWEEN MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR
MARKERS FOR GENETIC DIVERSITY ANALYSIS APPLIED TO FORAGE
PALM GENOTYPES PROPAGATED VIA BIOREACTORS**

**(Artigo formatado de acordo com as normas da Revista Industrial Crops and
Products - ELSEVIER)**

1 **Congruence between morphological and molecular markers for genetic diversity**
2 **analysis applied to forage palm genotypes propagated via bioreactors**

3 Selma Silva Rocha*^a, Luciana Cardoso Nogueira Londe^b, Samy Pimenta^a, Maurício
4 Mendes Cardoso^c, Nívio Poubel Gonçalves^c, Wellington Silva Gomes^a, Jéssica Guerra
5 Calaes^a

6 ^aUniversidade Estadual de Montes Claros, Reinaldo Viana 2630, 39440-000, Janaúba,
7 MG, Brasil, Departamento de Ciências Agrárias.

8 ^bResearcher EPAMIG Norte de Minas. Rodovia MGT 122, km 155. Campo
9 Experimental do Gorutuba. Nova Porteirinha – MG, Brazil

10 ^cResearcher EPAMIG Norte de Minas, Rodovia MGT 122, km 155, Campo
11 Experimental do Gorutuba, Nova Porteirinha, MG, Brazil.

12
13 **ABSTRACT:** The *in vitro* multiplication of forage palm by temporary immersion
14 bioreactors (TIBs) is a technique that allows the young plants production in a large scale
15 with genetic and health quality. Phenotypic variables expressed at this stage may be
16 useful in estimating genetic dissimilarity among forage palm species. One way to
17 confirm to this hypothesis is to compare it with dissimilarity obtained via molecular
18 analysis. The objective was to estimate the genetic divergence among eleven forage
19 palm genotypes through morphological characterization in *in vitro* propagation and to
20 relate it to molecular characterization. Genotypes were multiplied in temporary
21 immersion bioreactors. At this phase, morphological descriptors such as length,
22 diameter, dry and fresh mass of cladodes was evaluated. Molecular genotyping was
23 performed by DNA extraction from young cladodes using (RAPD) *primers*.
24 Dissimilarity based on molecular markers was estimated using the Jaccard Index. The
25 morphological characteristics were compared individually by the Scott-Knott cluster
26 test ($p < 0.05$) and were compared together for dissimilarity by Euclidean distance.
27 Individual dendrograms were obtained for each analysis using the UPGMA method. A
28 tanglegram was generated to illustrate the similarities between the associations of the

29 two dendrograms. There were significant differences in all characteristics related to
30 length, cladode width, fresh and dry mass of plants. The morphological descriptors
31 obtained via temporary immersion bioreactors maintained all intrinsic morphological
32 characteristics of the genotypes, grouping them according to genus. Based on the
33 morphological characterization, it was possible to obtain two distinct groups.
34 Morphological similarity was observed between pairs of genotypes of different genera
35 and species. Molecular investigation allowed us to differentiate genotypes at species and
36 genera levels, discriminating those considered morphologically similar. Molecular
37 research made it possible to differentiate genotypes at species and genus level,
38 discriminating those considered morphologically similar. The comparison between
39 morphological and molecular data revealed divergences and similarities. The obtained
40 information is useful in understanding the diversity within groups and how it is
41 structured. Molecular markers outline these groups indicating the existence of genetic
42 divergence. Morphological descriptors, obtained through bioreactors, are useful in
43 studies of genetic diversity in forage palm.

44 **Keywords:** *Cactaceae*; Temporary immersion bioreactor; *Opuntia spp*; *Nopalea spp*.

45

46 INTRODUCTION

47

48 Although the Brazilian semiarid is marked by a very unstable climate, wich is
49 characterized by poor rainfall distribution; there are some plants species that adapted to
50 this scenario, such as the forage palm (*Opuntia sp.*). This cactaceous is rich in vitamins,
51 minerals and amino acids, It is a food supplement of high nutritional power, both animal
52 and human (Villa Nova, 2018).

53 Forage palm multiplication usually occurs by cladding cutting, but it is slow to
54 grow, and seedling availability occurs two years after planting (Peixoto et al., 2008). In
55 addition to making the process of seedling acquisition difficult, it also causes difficulties
56 for breeding programs in selection phases.

57 The selection process in breeding programs occurs through the knowledge of the
58 genetic divergence existing between individuals. Quantification of divergence can be
59 done by molecular markers or morphological (Vieira, 2005).

60 Through molecular markers, it is possible to directly access an individual's
61 genotype through DNA. Allowing to obtain a practically unlimited number of genetic
62 polymorphisms, avoiding possible errors in phenotypic expression to the detriment of
63 environmental influence (Miranda, 2014).

64 Morphological markers are based on phenotypic characteristics of easily
65 visualized plants. However, it has the disadvantage of being identified, mostly, only in
66 whole or adult plant, which may cause delay in the selection process (Cattaneo, 2015).
67 This delay is even greater in species that are slow to develop such as the forage palm.

68 Knowing that micropropagation promotes rapid plant multiplication, in less time
69 than required by the conventional planting method. It is interesting to apply it in studies

70 of genetic divergence, taking advantage of the characterization of genotypes in early
71 stages.

72 The morphological characterization in the seedling phase is of high relevance in
73 breeding programs, as it provides information in the early phase of plant development.
74 This information can help the breeder in choosing which genotypes to follow in the
75 breeding process according to the desired objective (Oliveira, 2019). However, knowing
76 the possible environmental influence, it is necessary to verify if this genetic variability
77 obtained is in fact compatible with the existing genetic variability, which can be
78 detected via molecular markers.

79 Thus, this study was developed in order to estimate the genetic divergence of
80 eleven genotypes of forage palm through morphological markers obtained by *in vitro*
81 multiplication via temporary immersion bioreactors (TIBs) and to relate it to the
82 divergence obtained by DNA markers.

83 **MATERIALS AND METHODS**

84

85 The experiment was conducted at the Plant Biotechnology Laboratory of the
86 Agricultural Research Company of Minas Gerais - EPAMIG, EPAMIG Norte -
87 Gorutuba Experimental Field, Nova Porteirinha-MG, and at the Laboratory of
88 Molecular Biology of the State University of Montes Claros – UNIMONTES/Campus
89 Janaúba-MG, during the years 2018/2019.

90 Eleven forage palm genotypes from Gorutuba Experimental Field were used. The
91 geographical location is defined by the coordinates 15°14'8"263" south latitude and
92 43°17'650" west longitude, the average elevation of 526 m. These genotypes came from
93 the germplasm bank of the Agronomic Institute of Pernambuco-IPA (Table 1).

94 2.1 Morphological evaluation

95

96 In order to evaluate the morphological characteristics of 11 genotypes, an
97 experiment was performed in a completely randomized design with 20 replications,
98 each repetition consisting of one explant. Explants were obtained from *in vitro*
99 establishment of young cladodes buds in solid medium MS (Murashige e Skoog, 1962),
100 supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, 0.1 g L⁻¹ inositol, 4 mg L⁻¹ BAP (6-
101 Benzylaminepurine) and 7 g L⁻¹ of agar with pH adjusted to 5.8. This material remained
102 in the growth room for 60 days, or until budding, under irradiation of 40 μmol m⁻² s⁻¹
103 provided by cool white light, with 16 hours of photoperiod at 25 ± 2°C. The originated
104 sprout was subcultured every 30 days in culture medium of the same composition for
105 90 days, reaching the fourth subculture.

106 The originated sprouts were individualized and standardized, having a
107 predefined size of 0.5 cm in length, and transferred to the TIB, containing 1 liter of
108 liquid nutrient solution MS, supplemented with 200 mg L⁻¹ ascorbic acid and 0,25 ml
109 PPM (Plant Preservative Mixture Sigma). The immersion time of the explants was
110 adjusted to three minutes every four hours. The treatments remained in a growth room
111 submitted to a 16-hour photoperiod obtained from white LED lamps (40 μmol m⁻² s⁻¹)
112 and an average temperature of 25°C for a period of 30 days.

113 After the implantation period, the following morphological characteristics were
114 evaluated: plant height (cm), cladode diameter (mm), fresh and dry matter mass (g). The
115 characteristic plant height comprised the distance measured by caliper from the apex of
116 the cladode to the base of the plant. The diameter that comprised the width was
117 measured by the lateral edges of the plant measured by digital caliper. All plants were

118 weighed to determine fresh mass. The determination of dry mass was obtained from
119 pre-dried samples in a forced air oven, at 65°C (Zenebon et al., 2008).

120 The obtained characteristics were submitted to tests to verify the assumptions of
121 the analysis of variance (ANOVA). Data normality was observed by Lilliefors test (p
122 <0.05) and homogeneity of variances by Hartley test ($p <0.05$). The characteristics
123 fresh and dry mass were transformed using the function $Y = (\sqrt{x + 1})$ due to the absence
124 of normality. Given the assumptions, the characteristics were submitted to the F test
125 with a 5% error of probability. When significant, the means were compared by the
126 Scott-Knott clustering test ($p <0.05$). All analyzes were obtained using Genes software
127 (Cruz, 2016).

128 Subsequently, multivariate analyzes were performed to determine the genetic
129 dissimilarity between the genotypes, obtaining the dissimilarity matrix by Euclidean
130 distance. Genetic divergence was represented by dendrogram obtained by the
131 hierarchical Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA),
132 which groups individuals according to similarity (Cruz and Carneiro, 2003). The cluster
133 validation by the UPGMA method was determined by the cophenetic correlation
134 coefficient (CCC). For the dendrogram cut, the method proposed by Mojena (1977) was
135 adopted, which is based on the relative size of the dendrogram merger levels (distances)
136 (Faria, 2012). The relative contribution of quantitative characters was calculated
137 according to Singh's method (1981). Data were analyzed using R software version 3.5.2
138 using Cluster, RCMR and Ade4 packages.

139 **2.2 Molecular evaluation**

140

141 DNA was extracted from young cladodes taken from the experimental field of
142 EPAMIG Norte (Table 1). The hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) method

143 was used according to the methodology of Doyle and Doyle (1990). To verify the DNA
144 quality, a 0.8% agarose gel stained in ethidium bromide solution (0.2 mg / L) was used.
145 The amount of DNA was estimated by spectrophotometry at 260 nm. Thereafter,
146 dilution was performed by standardizing all samples to 10 ng DNA/ μ L.

147 The samples were subjected to amplification reactions composed of the
148 following final concentrations: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8.3); 2.5 mM MgCl₂;
149 2.5 mM dNTPs; 0.4 mM primer; 25 ng genomic DNA; 1.0 unit Taq DNA polymerase
150 (Synapse) and ultrapure water to complete final volume. The amplifications were
151 performed in a Techne thermocycler, model TC-412, using a program under the
152 following conditions: initial denaturation at 94 °C for three minutes; followed by 40
153 cycles of 94 °C for 15 seconds, annealing temperature of 50 °C for 30 seconds for each
154 primer and extension at 72 °C for 90 seconds; to such end a final extension cycle of 72
155 °C for 4 minutes, followed by a cycle at 4 °C until samples were taken from the thermal
156 cycler.

157 The products of amplification were separated by electrophoresis on a 1.2%
158 agarose gel and 1X TBE buffer for one hour and stained in 0.05 mg/ml ethidium
159 bromide solution for a period of 15 minutes. The amplified fragments were visualized
160 under ultraviolet light and photographed in a UVP Life Science Software digital system.

161 Of the 100 *Random Amplified Polymorphic (RAPD) primers* tested, 16 provided
162 clear amplification products, which were used in all subjects (Table 2).

163 To quantify the genetic diversity between genotypes, the bands produced in
164 amplification by RAPD primers were coded. Resulting in a binary matrix (1 for
165 presence and 0 for absence of bands), the calculation of the dissimilarity matrix was
166 obtained by complementing the Jaccard Index. Genetic divergence was represented by

167 dendrogram obtained by the UPGMA hierarchical method. To verify the consistency of
168 the grouping, the cophenetic correlation coefficient (CCC) was calculated. Data were
169 analyzed using R software version 3.5.2 using Cluster, RCMDR and Ade4 packages.

170 **2.3 Joint analysis of morphological and molecular characteristics**

171

172 A tanglegram was generated to illustrate the similarities and divergences
173 between the associations of the two dendrograms, using the UPGMA method for
174 hierarchical *cluster* analysis. Settled dendrograms (morphological and molecular) were
175 drawn in front of each other, using helper lines to connect samples and establish a
176 network of interactions. For this analysis were used the software R version 3.5.2., with
177 the aid of the Dendextend package.

178 **RESULTS AND DISCUSSION**

179 **3.1 Morphological characterization in temporary immersion bioreactors**

180

181 The effect of genotypes was significant for all characteristics evaluated. It was
182 observed the formation of four distinct groups, with high variability, in relation to the
183 genotypes averages, except for dry mass characteristic (Table 3). Significant differences
184 were expected to occur, as they are forage palm materials that have some contrasting
185 phenotypic characteristics. This situation, according to Cruz and Regazzi (1994) is a
186 very favorable indication for the study of genetic divergence, especially for detecting
187 the level of genetic variability present between accessions of genera and distinct
188 species.

189 The genotypes, IPA 200002 and IPA 100004, obtained plant height ranging from
190 11.20 to 19.97 cm, respectively. Genotypes of the genus *Nopalea* usually have shorter
191 size when compared to those of the genus *Opuntia* (Marques et al., 2017).

192 It was verified in this work that the genotype IPA 100004 of the genus *Nopalea*,
193 presented smaller cladode length. Paixão (2012), evaluating morphological traits in
194 three-year-old forage palm genotypes in the field, also observed superiority of species
195 of the genus *Opuntia* over genus *Nopalea*. Santos et al. (2015) also verified this fact by
196 multiplying both genera in the conventional method *in vitro*. It is important to
197 emphasize that these authors worked with most genotypes used in this work. However,
198 the evaluation conditions were different. This is, to a certain extent, advantageous for
199 the TIB propagation method, as it has maintained the same phenotypic characteristics
200 when using morphological characterization in the field.

201 It is noteworthy that the IPA 100001 and IPA 200002 genotypes obtained higher
202 cladode height and diameter (Table 3). The first is already described for presenting large
203 size and broad cladodes, according to the descriptors used by Gallegos Vázquez, (2005).
204 This explains its better development, in TIB propagation, in all evaluated
205 characteristics. In *in vitro* multiplication, Rocha et al. (2018) also observed better
206 development of this genotype.

207 With these results, it can be inferred that the use of TIBs, in addition to the
208 advantages of *in vitro* propagation can be useful in the morphological characterization
209 of plants. With the advantage of reducing the selection time of promising genotypes,
210 which can be used in breeding programs. Successful use of TIBs has been reported for
211 the large-scale propagation of various species such as, sugar cane (Lott, 2018),
212 strawberry (Camargo et al., 2019), eucalyptus (Máximo, 2018), bamboo (García
213 Ramírez et al., 2019) and forage palm (Zingale, 2016), presenting a higher
214 multiplication rate than conventional micropropagation.

215 For dry and fresh mass traits, it was observed superiority of genotypes of the
216 genus *Opuntia* when compared to genus *Nopalea* (Table 3). Genotypes of the genus
217 *Opuntia* are superior for the mass production characteristic than those of the genus
218 *Nopalea*. This is because species of the genus *Opuntia* usually have larger and heavier
219 cladodes, which influences the high values of fresh and dry mass (Leite, 2009). It is
220 evident that the TIB micropropagation method does not change the expected phenotypic
221 performance for these characteristics. Thus, such characteristics in this
222 micropropagation process can be indicated in studies of genetic divergence.

223 Selecting genotypes in plant breeding requires the simultaneous consideration of
224 multiple traits of agronomic importance (Schmit et al., 2018). And the study of genetic
225 diversity is performed from the information set of these characters, making it easier to
226 visualize the dissimilarities between genotypes. Thus enabling a better basis for making
227 decision in breeding programs (Miranda, 2019).

228 With a cophenetic correlation coefficient of 85.51%, showing an adequate
229 relationship between the genetic distance matrix and the dendrogram, it was possible to
230 observe the formation of two distinct groups from the morphological evaluations
231 (Figure 1). The importance of checking the magnitude of CCC is highlighted, as it
232 estimates the degree of agreement between the dendrogram formed by the clustering
233 method and the matrix of genetic distances (Nardino et al., 2017). When the correlation
234 coefficient is above 80% there is a good fit between the two matrices (Cargnelutti et al.,
235 2010).

236 Considering the established cutting point, two distinct groups were formed
237 (Figure 1). The first group consists only of the IPA 200002 genotype. This isolation
238 may be justified by its better performance in all morphological characteristics evaluated

239 individually (Table 1). Research results with this genotype are still scarce, especially as
240 a result of having recently been obtained (Santos et al., 2013). However, it is described
241 for presenting morphological characteristics similar to *Gigante* genotype, such as:
242 upright growing, little branched stem, large rackets weighing up to 1 kg and length of
243 50 cm. Considered the most productive and best suited to dry regions (Marques et al.,
244 2017).

245 It is observed that the genotypes that made up the second group have distinct
246 genera and species (Figure 1). It is evident that the morphological characteristics
247 considered did not allow the differentiation of genotypes, at least at the genus level, a
248 fact attributed to the distinct performance of IPA 200002. However, an intragroup
249 analysis highlights the absence of dissimilarity between pairs of genotypes, such as IPA
250 200173 and IPA 100412, of the same species. As well as the IPA100414 and
251 IPA100002 genotype pairs. Also, phenotypic similarity between varieties of distinct
252 genera, such as IPA 200016 and IPA 200205, evidencing low genetic variability in
253 these genotypes for the characters collected in TIB propagation.

254 It is also verified that in the second group there is detection of genetic similarity
255 between two varieties, both *O. ficus-indica* Mill. Admittedly similar under growing
256 conditions. That are the genotypes *Redonda* (IPA 100002) and *Gigante* (IPA 100001)
257 (Figure 1). These are very close morphologically genotype since the Redonda genotype
258 originates from the *Gigante* genotype (Galvão Junior et al., 2014).

259 All evaluated characters contributed to a greater or lesser extent to determine
260 genetic divergence (Table 4). The most important traits for genetic divergence were
261 cladode height and dry mass, which together accounted for 58.73% of the total variation
262 among the evaluated individuals. The characteristic diameter of cladode has been shown

263 to be of little importance for genetic divergence studies. According to Correa Gonçalves
264 (2015), the great interest in evaluating the relative importance of characters lies in the
265 possibility of discarding characteristics that contribute little to the discrimination of the
266 evaluated material, thus reducing labor, time and cost spent on tests.

267 **3.2 Molecular characterization based on RAPD markers**

268

269 Molecular markers have been widely used for detection of genetic dissimilarity
270 in genotypes of genera *Opuntia* and *Nopalea* (García-Zambrano, et al., 2018; Las Casas,
271 et al., 2018; Samah, et al., 2016; De Lyra, et al., 2015). It is important for these studies,
272 mainly because they consider in the genetic dissimilarity estimation, only the genotypic
273 and not the phenotypic constitution, which can be influenced by the environment.
274 Govindaraj et al. (2015) stated that with the use of molecular markers in genetic
275 diversity studies, there is a guarantee of speed and quality of the generated data, being
276 possible to characterize a larger number of germplasm with limited time and resources.

277 Based on the estimated genetic diversity via RAPD markers between forage
278 palm genotypes, it was possible to verify the formation of two distinct groups (Figure
279 2). The cophenetic correlation coefficient obtained was 96.73%, evidencing the
280 consistency of the integrity of the formed clusters.

281 It is observed that the *Orelha de Elefante Mexicana* (IPA 200016) has greater
282 dissimilarity remaining isolated in group I, while the others gathered in group II (Figure
283 2). In group II it is possible to detect genetic similarity between pairs of genotypes IPA
284 100001 and IPA 100414, of the same genus. As well as IPA 200173 and IPA 200174
285 pairs, of the same genus, but of different species. These similarities were also verified in
286 the morphological analysis (Figure 1), confirming the low genetic variability between
287 these genotypes.

288 In group II, by adopting a percentage of genetic divergence around 80%, seven
289 subgroups were formed (Figure 2). It is possible to verify genetic dissimilarity between
290 genotypes considered similar in the morphological analysis. As the IPA 200016 IPA
291 and 200, 205 pairs, both distinct genus, as well as the genotypes IPA 200174 and IPA
292 100412 of the same genus, but distinct species. Also, dissimilarity between genotypes
293 of the same species, such as IPA 100004 and IPA 200205 and, pairs IPA 100414 and
294 IPA 100002.

295 It is important to highlight that the IPA 200205 and IPA 100004 genotypes are
296 already described in the literature because they are morphologically similar. IPA
297 200205 arise after burning an area previously cultivated with Miúda palm, identified as
298 IPA 100004 (Santos et al., 2014). Similarly IPA 100002 is described as originating from
299 the These are very close morphologically genotypes since the Redonda genotype
300 originates from the Gigante genotype Gigante (IPA 100001) presenting phenotypic
301 similarities (Galvão Junior et al., 2014). Although, these genotypes are described as
302 morphologically similar (Figure 1), it was observed by molecular analysis that they are
303 genetically distinct from each other, presenting high genetic variability.

304 Thus, the ability to detect genetic variability among the genotypes evaluated in
305 this work through RAPD markers, is remarkable. According to Lyra et al. (2015) from
306 the molecular analysis, it is observed that the phenotype is not a linear function of the
307 genotype, and the large variations found in species of the genus *Opuntia* are mainly due
308 to their high interspecific and intraspecific hybridization capacity, polyploidy, sexual
309 reproduction and high apomixis rate.

310

311 **3.3 Comparison between dissimilarity methods**

312

313 From the information resulting from the morphological and molecular
314 characterization, it was possible to obtain two distinct groups. However, the
315 arrangement between genotypes in the joint analysis did not remain the same (Figure 3).
316 The entanglement value was 0.52 showing the divergence in genotype distribution in
317 both dendrograms. Entanglement measures genotype matching between distinct
318 dendrograms, ranging from 1 (complete entanglement) to 0 (no entanglement). A lower
319 entanglement coefficient corresponds to a good alignment (Santos et al., 2018).

320 Only the IPA 100410, IPA 100002, IPA 200174, and IPA 200173 genotypes
321 remained in the same position, i.e., had minor changes between clusters (Figure 3). This
322 result indicates convergence between morphological and molecular divergence
323 analyzes. According to Pereira et al. (2018), analyzes that consider qualitative and
324 quantitative variables simultaneously, such as the Gower method, tend to be more
325 efficient, mainly because they consider a larger number of information for the diversity
326 study. Note that in this case, as each dendrogram was obtained by a distinct algorithm,
327 Euclidean and Jaccard, the non-similarity may be attributed to the mathematical models
328 of each algorithm. It is important then to observe how similar are the different methods
329 in obtaining dissimilarity.

330 For most genotypes, inconsistencies between the methods are noted (Figure 3).
331 This is possibly due to the fact that the molecular markers used are not specific to the
332 phenotypic characteristics evaluated. They amplify more conserved regions of the
333 genome, and it is not possible, in this case, to assimilate a molecular mark to a certain
334 phenotypic characteristic (Costa, 2015). On the other hand, this fact may also be
335 associated with better accuracy of molecular analysis compared to the morphological

336 analysis. Molecular data are often considered less ambiguous, more easily reproducible
337 and less susceptible to convergence compared morphological data. This is because they
338 detect polymorphism directly at the DNA level, having no kind of environmental or
339 genetic influence (Gaubert et al., 2005).

340 Although, it is obvious, one way to assess the reliability of morphological data
341 would be to compare it with a molecular data set and investigate the source of
342 discrepancies between the two data sets (Bapst, 2017). Note that there was a low
343 relationship between the two data sets. Morphological markers contributed less to
344 differentiation between genotypes. However, doing a general approach, it is noted that
345 the gathering of genetic information, via different sources, such as molecular and
346 morphological, allows a greater understanding of the estimated genetic variability. In
347 this study, the low variability can be mostly attributed to the origin of the considered
348 genotypes.

349 **CONCLUSION**

350

351 Among the morphological markers, the characters that most contributed to genetic
352 divergence were plant height and dry mass.

353 Molecular markers were able to distinguish morphologically similar genotypes.

354 Genetic divergence can be detected between forage palm genotypes propagated by
355 temporary immersion bioreactors.

356 **ACKNOWLEDGEMENTS**

357

358 The authors makes grateful acknowledgement to the following organizations:
359 Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and

360 National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the
361 financial support.

362 **COMPETING INTERESTS**

363 Authors have declared that no competing interests exist.

364 **REFERENCES**

365

366 Camargo, S.S., Rufato, L., Magro, M., Souza, A.L.K.D., 2019. Temporary immersion
367 biorreators: efficient technique for the propagation of the 'Pircinque' strawberry. *Rev.*
368 *Bras. Frutic.*, 41(1)11-27. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019102>.

369 Cargnelutti Filho, A., Ribeiro, N.D., Burin, C., 2010. Consistência do padrão de
370 agrupamento de cultivares de feijão conforme medidas de dissimilaridade e métodos de
371 agrupamento. *Pesq. Agropec. Bras.*, 45(3)236-243. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000300002>.

373 Cattaneo, L.F., 2015. Melhoramento genético do mamoeiro assistido por marcadores
374 moleculares. *Papaya Bras.*, 191-208.

375 Correa, A.M., Gonçalves, M.C., 2015. Divergência genética em genótipos de feijão
376 comum cultivados em Mato Grosso do Sul. *Rev. Ceres*, 59, 206-212.
377 <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000200009>.

378 Cruz, C.D. 2016. Genes Software: extended and integrated with the R, Matlab and
379 Selegen. *Acta Sci., Agron.*, 38(4)547-552. <https://doi0.4025/actasciagron.v38i4.32629>.

380 Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S., Regazzi, A.J. 2014. Modelos biométricos aplicados ao
381 melhoramento, terceira ed. Viçosa, MG: UFV.

382 Cruz, C.D., Regazzi, A.J., Carneiro, P.C.S. 2012. Modelos biométricos aplicados ao
383 melhoramento genético, quarta ed. Viçosa, MG: UFV.

384 Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*,
385 12(1):13-15.

386 Faria, P.N., Cecon, P.R., Silva, A.R., Finger, F.L., Silva, F.F., Cruz, C.D., Savio, F.L.,
387 2012. Métodos de agrupamento em estudo de divergência genética de pimentas. Hort.
388 Bras., 30(3):428-432, <https://doi.org/10.1590/S0102-05362012000300012>.

389 Gallegos-Vázquez, C., Cerventes Herrera, J., 2005. Manual gráfico para la descripción
390 varietal del nopal tunero y xoconostle (*Opuntia* spp.). Servicio Nacional de Inspección y
391 Certificación de Semillas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca
392 y Alimentación (SNICS-SAGARPA) y la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).
393 Chapingo, México.

394 García-Ramírez, Y., Barrera, G.P., Seijo, M.F., Barbón, R., Concepción-Hernández, M.,
395 Mendoza-Rodríguez, M.F., Torres-García, S., 2019. Effect of sucrose on physiological
396 and biochemical changes of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl
397 in temporary immersion. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 137, 239-247.
398 <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01564-z>.

399 García-Zambrano, E.A., Ojeda-Zacarías, M.C., Gutiérrez-Soto, J.G., Sinagawa-García,
400 S.R., Gutiérrez-Díez, A., Martínez-de la Cerda, J., Pedroza-Flores, J.A., Gallegos-
401 Vázquez, C., Zambrano-García, J.I., 2018. Molecular differentiation of Xoconostle
402 (*Opuntia* spp.) using AFLP molecular markers. *Phyton-International Journal*
403 *Experimental Botany*, 87, 87-93.

404 Gaubert, P., W.C Wozencraft, P. Cordeiro-Estrela, G. Veron. Mosaics of convergences
405 and noise in morphological phylogenies: what's in a viverrid-like carnivoran?., 2005.
406 *Systematic Biology*, v. 54, n. 6, p. 865-894.
407 <https://doi.org/10.1080/10635150500232769>.

408 Govindaraj, M., Vetriventhan, M., Sirinivasan, M., 2015. Importance of genetic
409 diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical
410 perspectives. *Genetics Research Intern.*, 43, 14-87.
411 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/431487>.

412 Júnior, J.G.B.G., Silva, J.B.A., Morais, J.H.G., Lima, R.N., 2014. Palma forrageira na
413 alimentação de ruminantes: cultivo e utilização. *Acta Vet. Brasílica*, 8(2):78-85.
414 <https://doi.org/10.21708/avb.2014.8.2.3490>.

415 Las Casas, G., Distefano, G., Caruso, M., Nicolosi, E., Gentile, A., La Malfa, S., 2018.
416 Relationships among cultivated *Opuntia ficus-indica* genotypes and related species
417 assessed by cytoplasmic markers. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 65, 759-773.
418 <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0569-2>.

419 Leite, M.L.M.V., 2009. Avaliação de clones de palma forrageira submetidos a
420 adubações e sistematização de informações em propriedades do semiárido paraibano.
421 186 f. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2009.

422 Lyra, M.C.C.P., Silva, M.L.R.B., Mergulhão, A.C.E.S., Mondragon-Jacobo, C.,
423 Martinez-Romero, E., 2015. Molecular studies of forage prickly-pear cactus from the
424 semiarid of Pernambuco State-Brazil. *J. Appl. Biol. & Biotechnol.*, 3(2):1-5. [https://doi:](https://doi:10.7324/JABB.2015.3201)
425 [10.7324 / JABB.2015.3201](https://doi:10.7324/JABB.2015.3201).

426 Marques, O.F.C., Gomes, L.S.P., Mourthé, M.H., Santos Braz, T.G., Pires Neto, O.S.
427 2017. Palma forrageira: cultivo e utilização na alimentação de bovinos. *Cad. Ciênc.*
428 *Agra.* 9(1):75-93.

429 Máximo, W.P.F., Santos, P.P.A., Martins, G.S., Mendonça, E.G., Paiva, L.V., *In vitro*
430 multiplication of *Eucalyptus* hybrid via temporary immersion bioreactor: culture media
431 and cytokinin effects. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 18(2):2131-138.
432 <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332018v18n2a19>.

433 Miranda, E.A.G.C. Transferibilidade e validação de marcadores microssatélites
434 derivados de EST para duas espécies de *Campomanesia* (Myrtaceae) do Cerrado. 103 f.
435 Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)-Instituto de Ciências
436 Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

437 Miranda, M.C.C. Diversidade genética entre genótipos de algodoeiro visando ampliação
438 da variabilidade. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de
439 Uberlândia, 2019.

440 Mojena, R. 1977. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation.
441 *Comput. J.* 20(4):359-363.

442 Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with
443 tobacco tissue cultures. *Physiologia Plant.*, 15-473-497.

444 Nardino, M., Baretta, D., Carvalho, I.R., Follmann, D.N., Ferrari, M., Pelegrin, A.J.,
445 Szareski, V.J., Konflanz, V.A., Souza, V.Q. Genetic divergence among corn (*Zea mays*
446 L.) genotypes in distinct environments. Rev. Ciênc. Agra, 40(1):164-174, [https://doi:
447 http://dx.doi.org/10.19084/RCA16013](https://doi.org/10.19084/RCA16013).

448 Oliveira, C.S., Peixoto, J.V.M., Momesso, M.P., Pereira, L.M., Peres, H.G., Maciel,
449 G.M. 2019. Características de plântulas: dissimilaridade genética entre acessos de
450 pimenta. Rev. Ciência, Tecnol. Ambiente, 9(1):2-8,2019.

451 Oliveira, C.S., Peixoto, J.V.M., Momesso, M.P., Pereira, L.M., Peres, H.G., Maciel,
452 G.M. Parâmetros morfo-fisiológicos e comportamento agrônômico no campo de
453 bananeiras produzidas em biorreator de imersão temporária. Tese (Doutorado em
454 Biotecnologia)-Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

455 Paixão, S.L., Avaliação morfológica de clones e progênes de palma forrageira. 70 f.
456 Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife,
457 2012. 2012.

458 Peixoto, M.J.A., Carneiro, M.S.S., Souza P.Z., Diniz, J.D.N., Souto, J.S., Campos,
459 F.A.P. 2006. Desenvolvimento de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., em diferentes
460 substratos, após micropropagação *in vitro*. Acta Scientiarum. Animal Sciences,
461 28(1):17-20.

462 Pereira, C.C.A., Medeiros, M.G., Silva Neto, J.S.S., Queiróz, M.A., Barros Júnior, A.
463 P., Silveira, L.M., 2018. Genetic Divergence and Importance of Traits in *Luffa*
464 *cylindrica* L. Journal Exp. Agric. Internat., 28(4):1-9.
465 <https://doi.org/10.9734/JEAI/2018/44544>.

466 Preczenhak, A.P., 2013. Diversidade genética estimada por meio de marcadores
467 moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate. Dissertação (Mestrado em
468 Produção Vegetal)-Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

469 Rocha, S.S., Londe, L.C.N., Calaes, J.G., Pereira, J.C.G. 2018. Effect of lighting
470 spectrum and naphthaleneacetic acid (NAA) on in vitro development of cactus pear
471 [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill]. Aust. J. Crop Sci., 12(12):1837-1843. doi:
472 10.21475/ajcs.18.12.12.p1104.

473 Samah, S., Pardo, C.V.T., Cruz, M.A.S., Valadez-Moctezuma, E., 2016. Genetic
474 diversity, genotype discrimination, and population structure of Mexican *Opuntia* sp.,
475 determined by SSR Markers. *Plant Mol. Biol. Report.*, 34:146-159,
476 <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0908-4>.

477 Santos, D.C., Silva, M.C., Dubeux Júnior, J.C.B., Lira, M. A., Silva, M.C., 2014.
478 Estratégias para uso de cactáceas em zonas semiáridas: novas cultivares e uso
479 sustentável das espécies nativas. *Rev. Cient. Prod. Anim.*, 15(2):111-121.

480 Santos, M.A., Santos, B.R.C., 2018. Cunha dos Santos. Silagem da palma forrageira
481 consorciada com resíduos da mandioca e bagaço da cana de açúcar: revisão. *PUBVET*,
482 12(11):1-8, <https://doi.org/10.31533/pubvet.v12n11a212.1-8>.

483 Santos, T.D.N., Melo, K.G.P., Correia, R.C., Melo, N.F., 2015. Avaliação da
484 micropropagação de dois genótipos de palma forrageira. In *Embrapa Semiárido-Artigo*
485 *em anais de congresso (ALICE)*. In: *Jornada de Iniciação Científica da Embrapa*
486 *Semiárido, Anais*. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2015.

487 Schmit, R., Melo, R.C., Trevisani, N., Coimbra, J.L.M., Guidolin, A.F., 2018. Seleção
488 multivariada entre e dentro de populações mutantes de feijão. *Rev. Ciênc. Agrovet.*
489 17(4):472-480. <https://doi.org/10.5965/223811711732018472>

490 Silva, L.M., Fagundes, J.L., Viegas, P.A.A., Muniz, E.N., Rangel, J.H.A., Moreira,
491 A.L., Backes, A.A., 2014. Produtividade da palma forrageira cultivada em diferentes
492 densidades de plantio. *Ciênc. Rural* 44(11):2064-2071, [http://dx.doi.org/10.1590/0103-](http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131305)
493 [8478cr20131305](http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131305).

494 Souza, J.T.A., Ribeiro, J.E., Ramos, J.P.F., Sousa, W.H., Araújo, J.S., Lima, G.F.C.,
495 Dias, J.A., 2019. Rendimento quântico e eficiência de uso da água de genótipos de
496 palma forrageira no Semiárido brasileiro. *Archivos Zootec.* 68(262):268-273.
497 <https://doi.org/10.21071/az.v68i262.4146>.

498 Vieira, E.A., Carvalho, F.I.F., Oliveira, A.C., Benin, G., Zimmer, P.D., Silva, J.A.G.,
499 Martins, A.F., Bertan, I., Silva, G.O., Schmidt, D.A.M., 2005. Comparação entre
500 medidas de distância genealógica, morfológica e molecular em aveia em experimentos
501 com e sem a aplicação de fungicida. *Bragantia*, 64(1):51-60.
502 <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052005000100006>.

503 Villa Nova, S.R.M., Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*): prospecção das
 504 tecnologias e potencialidades de inovação. Dissertação (Mestrado em Produção
 505 Intelectual)-Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

506 Zenebon, O., Pascuet, N.S., Tiglea, P. Métodos físico-químicos para análise de
 507 alimentos. 4. ed. versão digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

508 Zingale, N. 2016. Tecniche innovative di propagazione e di caratterizzazione di specie e
 509 varietà di *Opuntia* e generi affini. Dottorato (Produttività delle piante coltivate in
 510 ambiente mediterraneo)-Itália: Universtiá degli Studi Di Catania, 2016.

511

512

513 TABLE 1. Identification of forage palm genotypes used in the experiment. EPAMIG-
 514 Norte/ Nova Porteirinha- MG, 2019.

Genus	Genotypes	Species	Nº no BAG
	Orelha de elefante mexicana	<i>Opuntia strica</i> Haw	IPA-200016
	Orelha de elefante africana	<i>Opuntia undulata</i> Griffiths	IPA-200174
	Redonda	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-100002
	IPA 90-156	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-100414
<i>Opuntia</i>	Gigante	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-100001
	Marmillon Fodder - (1327)	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-200173
	IPA 90-111	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-100412
	COPENA-V1	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-200002
	IPA-90-92	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	IPA-100410
<i>Nopalea</i>	Miúda	<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm-Dyck	IPA-100004
	IPA Sertânia	<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm-Dyck	IPA-200205

515

516

517

518

519

520

521

522

523 TABLE 2. Selected RAPD *primers* for forage palm species. EPAMIG-Norte/ Nova
 524 Porteirinha- MG, 2019.

<i>PRIMERS</i>	SEQUENCE 5'→ 3'
OP 2	CCTGGGCTTG
OPG 05	CTGAGACGGA
OPH 18	GAATCGGCCA
OP 30	GGAGGGGGGA
OP 52	CCAACCACCC
OP 61	GGGTGTGGGT
OP 63	GGGTGGGTGT
OP 66	CCCACACCCA
OP 67	GGGAGAGGGA
OP 68	CCCACCCACA
OP 74	GGGTTGGGTG
OP 76	GAGCACCAGG
OP 80	GAGCACGGGG
OP 81	GGGCCCGAGG
OP 83	GGGCGCGAGT
OP 99	ATCGGGTCCG

525

526

527 TABLE 3. Morphological characteristics of forage palm accesses obtained during
 528 micropropagation by TIB. EPAMIG-Norte/ Nova Porteirinha- MG, 2019.

Genotypes	Height (cm)	Diameter(m m)	Fresh mass	Dry mass
IPA 200002	19.97a	6,66 a	1,2366 a	1,0152 a
IPA 100001	18.31 a	5,57 a	1,2633 a	1,0163 a
IPA 200205	17.14 b	3,63 d	1,0585 d	1,0061 d
IPA 100410	17.11b	5,22 b	1,1643 b	1,0104 c
IPA 100414	16.84 b	5,24a	1,1111 a	1,0045 d
IPA 200174	16.76 b	4,45 c	1,0758 d	1,0089 a
IPA 200016	15.61b	3,73 d	1,1456 b	1,0126 b
IPA 100002	14.71 c	5,18b	1,1610 b	1,0104 c
IPA 200173	13.85 c	4,60 c	1,1088 c	1,0088 c
IPA 100412	12.68 d	4,63 c	1,1225 c	1,0074 d
IPA 100004	11.20 d	3,89 d	1,0584 d	1,0059 d
CV (%)	19.00	17.09	3.89	0.3586

529 Averages followed by the same letter in the columns, belonging to the same grouping, by the Scott-Knott
 530 test with a 5% probability.

531

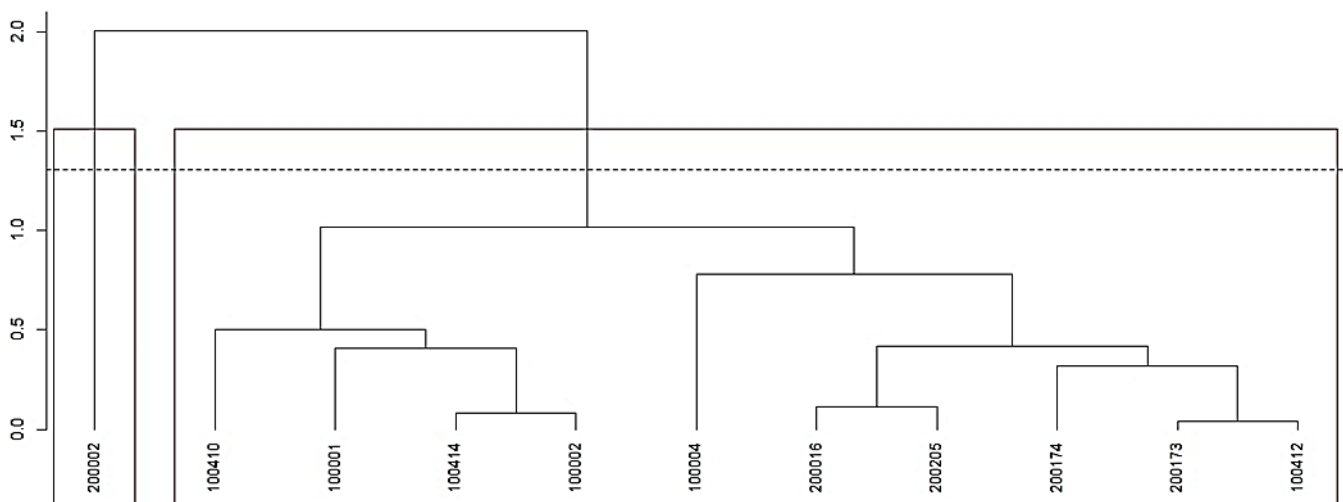
532 TABLE 4. Estimates of the relative contribution of each trait (S.j) to study genetic
 533 diversity among 11 forage palm genotypes, according to Singh (1981) criterion.
 534 EPAMIG-Norte/ Nova Porteirinha- MG, 2019.

Variable	Contribution	
	S. j	S. j (%)
Height	11.773948	30.1895
Diameter	7.522498	19.2884
Freshmass	8.572481	21.9806
Drymass	11.13127	28.5416

535 S.j: contribution of variable j to the value of Euclidean distance between genotypes.

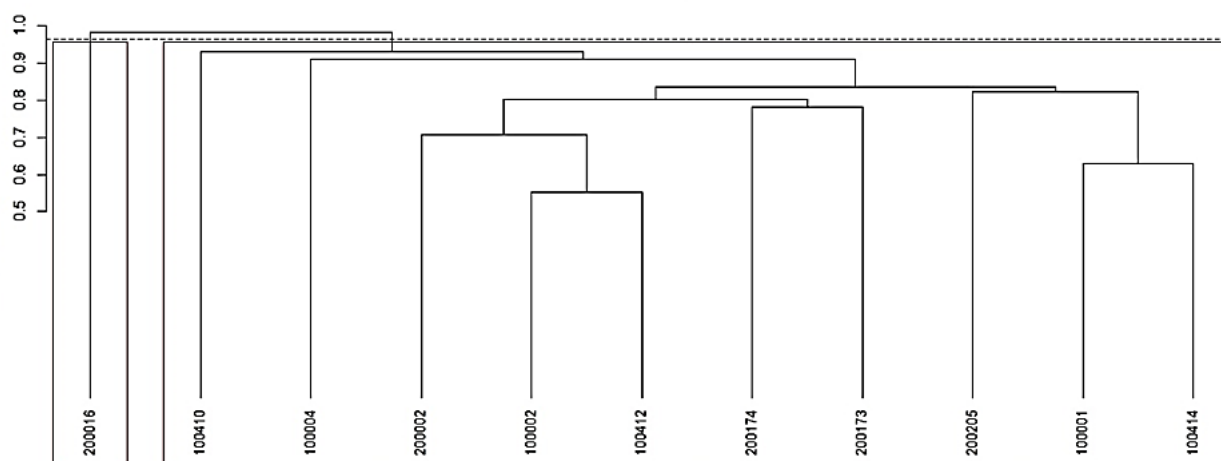
536

537



538 **FIGURE 1.** Dendrogram obtained by UPGMA clustering method of 11 forage palm
 539 genotypes, obtained from morphological characters collected in micropropagation in
 540 TIB. UNIMONTES, Janaúba-MG, 2019.

541



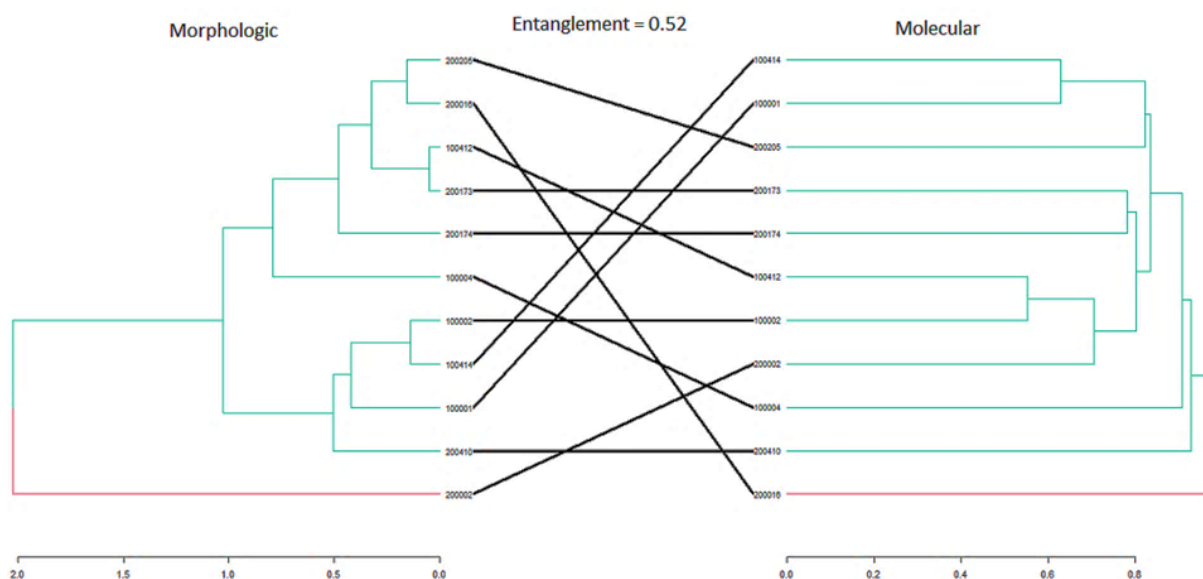
542

543 **FIGURE 2.**Dendrogram representing the genetic divergence among eleven forage palm
 544 genotypes, obtained by the UPGMA method, using the arithmetic complement of the
 545 Jaccard index as a measure of dissimilarity. UNIMONTES, Janaúba-MG, 2019.

546

547

548



549

550 **FIGURE 3.** Entanglement between 11 forage palm genotypes, obtained based on
 551 genetic dissimilarity considering morphological and molecular variables.
 552 UNIMONTES, Janaúba-MG, 2019.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados indicam que a propagação da palma forrageira por meio das técnicas da cultura de tecidos pode contribuir com os estudos de divergência genética e multiplicação *in vitro* dos genótipos.

De um modo geral, há uma tendência dos genótipos responderem melhor no sistema de multiplicação em BIT's, principalmente grande parte das *Opuntias* e suas espécies. Fato atribuído às características do gênero, e ao ambiente de cultivo por oferecer melhores condições de desenvolvimento, como a renovação da atmosfera interna e utilização do meio líquido, favorecendo rápida multiplicação e redução de custos. Por esse motivo, esse sistema foi escolhido para análise de divergência genética.

As estimativas de dissimilaridade fornecidas em BIT's foram úteis, pois parte das informações observadas foram confirmadas pelos marcadores moleculares. Por meio dos dados moleculares, foi possível detectar a expressão do ambiente sobre o fenótipo. Pois conseguiram distinguir genótipos considerados similares na análise morfológica. Isto sugere a importância de utilizar os marcadores morfológicos em conjunto com os moleculares. Visto que, as duas técnicas combinam a descrição do fenótipo e genótipo, possibilitando distinguir genótipos morfológicamente semelhantes, mas geneticamente diferentes.

Desse modo os problemas relativos à propagação convencional da palma forrageira, podem ser minimizados pelo uso dos biorreatores de imersão. Pois oferece boas condições de desenvolvimento, com multiplicação em curto espaço de tempo. Sendo assim, pode ser utilizado como descritores morfológicos em estudos de divergência genética, trazendo informações dos genótipos em fases iniciais de desenvolvimento.