



JOSÉ VICTOR MAURICIO DE JESUS

**VALIDAÇÃO DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE
GRÃO-DE-BICO PARA O REGISTRO DE CULTIVARES**

**LAVRAS – MG
2024**

JOSÉ VICTOR MAURICIO DE JESUS

**VALIDAÇÃO DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE GRÃO-
DE-BICO PARA O REGISTRO DE CULTIVARES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

Orientadora

Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos

Coorientadora

Prof. Dr. Sebastião Márcio de Azevedo

Coorientador

LAVRAS – MG

2024

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Jesus, José Victor Maurício de.

Validação de descritores morfológicos e moleculares na
identificação de cultivares de grão-de-bico para o registro de
cultivares / José Victor Maurício de Jesus. - 2024.

87 p. : il.

Orientador(a): Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Coorientador(a): Heloisa Oliveira dos Santos, Sebastião
Márcio de Azevedo.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Registro de cultivares. 2. Descritores. 3. Caracterização
genética. I. Von Pinho, Édila Vilela de Resende. II. Santos, Heloisa
Oliveira dos. III. Azevedo, Sebastião Márcio de. IV. Título.

JOSÉ VICTOR MAURICIO DE JESUS

**VALIDAÇÃO DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES NA
IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE GRÃO-DE-BICO PARA O REGISTRO DE
CULTIVARES**

**VALIDATION OF MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR DESCRIPTORS IN
CHICKPEA CULTIVAR IDENTIFICATION FOR CULTIVAR
REGISTRATION**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de Fevereiro de 2024.

Dr. Cleiton Lourenço de Oliveira UFLA

Dra. Renata Silva Mann UFS

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

Orientadora

Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos

Coorientadora

Prof. Dr. Sebastião Márcio de Azevedo

Coorientador

LAVRAS – MG

2024

*Aos meus pais, José Aparecido e
Maria Vera, que nunca mediram
esforços para que eu alcançasse
meus objetivos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia e ao Setor de Sementes por toda a colaboração e suporte técnico.

À Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela excepcional orientação, pelos valiosos ensinamentos e estímulos. Agradeço imensamente pela consideração, paciência, amizade e por todos os conselhos e esforços dedicados à execução deste trabalho.

Aos coorientadores, Profa Dra. Heloisa Oliveira dos Santos, Prof. Dr. Sebastião Márcio de Azevedo, pela amizade, orientação, disponibilidade e apoio na execução deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Warley Marcos Nascimento, chefe-geral da Embrapa Hortaliças, pelo apoio na condução do trabalho e envio de amostras de sementes.

Às colegas e amigas da Pós-graduação, Danielle, Carmélia, Mayra, Rafaela e Viviana pelo acolhimento, companheirismo e colaboração. A ajuda de vocês foi essencial para a conclusão desta pesquisa.

À equipe de funcionários do Setor de Sementes e do Laboratório Central de Pesquisa em Sementes (LCPS), em especial à Jaqueline, Geraldo e ao Itamar pela ajuda e disponibilidade durante a condução dos experimentos.

Aos estudantes e bolsistas de iniciação científica, Nicolas, Paulinha, Rafael e Laís, pelo compromisso, dedicação e apoio na condução e avaliação dos experimentos.

À equipe do setor de Olericultura, em especial à Stefany e ao Valdecir pelo auxílio na montagem e condução dos experimentos de campo.

Aos pesquisadores Dra. Dayliane Bernardes e Dr. Wilson Vicente pela colaboração nas análises.

Aos professores e funcionários do Departamento de Agricultura (DAG) pelos ensinamentos e contribuições.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

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

Muito obrigado!

RESUMO

O grão-de-bico (*Cicer arietinum*) é uma das mais importantes leguminosas de grãos alimentares do mundo. No Brasil, o cultivo tem ganhado destaque e novas cultivares têm sido disponibilizadas para os agricultores. No país, a produção, o beneficiamento e a comercialização de sementes e mudas estão condicionados à uma inscrição no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). A cultivar só poderá ser registrada se puder ser identificada e diferenciada das demais já existentes. Em consonância com o decreto nº 10.586 de 18 de dezembro de 2020 e com a portaria MAPA de nº 502 de 20 de dezembro de 2022, que oportuniza o uso de diferentes descritores para caracterização de materiais, objetivou-se neste trabalho avaliar descritores morfológicos e marcadores moleculares de proteínas e de DNA, para a distinção e validação de descritores de cultivares de grão-de-bico, visando Registro Nacional de Cultivares. Foram utilizadas 10 cultivares de grão-de-bico cujas sementes foram provenientes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Foi conduzido em casa de vegetação um experimento, com diferentes proporções de contaminações varietais junto às cultivares de grão-de-bico, para validar o potencial dos descritores. Para a caracterização morfológica, as plantas foram avaliadas com base nos descritores recomendados pela União para Proteção das Obtenções Vegetais (UPOV). Além disso, para analisar características relacionadas às sementes, foram empregadas medidas morfométricas utilizando o sistema GroundEye®. Esse sistema permitiu a quantificação das porcentagens de características geométricas, bem como características relacionadas às cores e suas dominâncias, oferecendo uma abordagem abrangente e precisa na análise morfológica das sementes de grão-de-bico. Na análise da pureza genética, foram calculadas as porcentagens e acerto e erro com base em avaliações realizadas por quatro especialistas da área de sementes que desconheciam a porcentagem existente de contaminação com outras cultivares. Para a análise de proteínas, foram utilizadas as técnicas de eletroforese Nativa PAGE e SDS PAGE. Foram avaliados os sistemas isoenzimáticos álcool desidrogenase, malato desidrogenase, catalase, esterase, superóxido dismutase, proteínas de armazenamento e proteínas resistentes ao calor. A estabilidade destas proteínas também foi avaliada, sob variação de dois níveis de nitrogênio, 50 kg.ha⁻¹ e 200 kg.ha⁻¹. O DNA foi avaliado utilizando a técnica SSR (*Simple Sequence Repeats*), com subsequente separação dos produtos por eletroforese em gel de poliacrilamida. As cultivares de grão-de-bico podem ser distintas e identificadas utilizando uma combinação de marcadores morfológicos, proteicos e de DNA. A análise de imagem de sementes pelo sistema GroundEye® permite uma caracterização precisa e diferenciação entre as cultivares de grão-de-bico, sendo uma abordagem valiosa para enriquecer o registro de informações das cultivares no RNC. Os níveis de adubação nitrogenada não alteraram a expressão das proteínas. A fase de desenvolvimento mais apropriada para a avaliação da pureza genética varia conforme a cultivar. O primer TA-203 destaca-se como um marcador importante para distinguir as cultivares brasileiras de grão-de-bico, contribuindo assim para o registro das mesmas.

Palavras-chave: *Cicer arietinum*. Identificação varietal. Caracterização genética. Distinção genotípica. Pureza genética.

ABSTRACT

Chickpea (*Cicer arietinum*) stands as one of the world's most significant legume crops. In Brazil, chickpea cultivation has gained prominence, with the introduction of new cultivars for farmers. Seed and seedling production, processing, and commercialization in Brazil require registration in the National Cultivar Registry (RNC) administered by the Ministry of Agriculture and Livestock (MAPA). Cultivars can only be registered if they can be identified and distinguished from existing ones. In line with decree n° 10.586 of December 18, 2020, and MAPA Ordinance n° 502 of December 20, 2022, which allow the use of different descriptors for material characterization, this study aimed to employ molecular analysis of proteins and DNA to distinguish between chickpea cultivars for registration in the National Cultivar Registry (RNC). Ten chickpea cultivars were used, sourced from the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Brazilian Agricultural Research Corporation). An experiment was conducted in a greenhouse, introducing varying levels of varietal contamination alongside chickpea cultivars to validate the descriptor's potential. For morphological characterization, plants were assessed based on descriptors recommended by the International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). Additionally, morphometric measures were employed to analyze seed characteristics using the GroundEye® system. This system facilitated quantification of geometric features, as well as color-related traits and dominances, providing a comprehensive and precise approach to chickpea seed morphological analysis. Genetic purity certification involved percentage calculation and accuracy and error determination based on evaluations by four evaluators/experts unaware of contamination percentages. Protein analysis utilized Native PAGE and SDS PAGE electrophoresis techniques. Isoenzymatic systems such as alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, catalase, esterase, superoxide dismutase, storage proteins, and heat-resistant proteins were evaluated. Protein stability was also assessed under two nitrogen levels, 50 kg.ha⁻¹ and 200 kg.ha⁻¹. DNA analysis utilized the Simple Sequence Repeats (SSR) technique, with subsequent product separation by polyacrylamide gel electrophoresis. Chickpea cultivars can be distinguished and identified using a combination of morphological, protein, and DNA markers. Image analysis of seeds using the GroundEye® system allows precise characterization and differentiation among chickpea cultivars, proving valuable in enriching cultivar information in the RNC. Nitrogen fertilization levels did not alter protein expression. The most appropriate developmental phase for genetic purity evaluation varies depending on the cultivar. The primer TA-203 standing out as an important marker for distinguishing Brazilian chickpea cultivars, thereby contributing to their registration.

Keywords: *Cicer arietinum*. Varietal identification. Genetic characterization. Genotypic distinction. Genetic purity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de cultivares de grão-de-bico (<i>Cicer arietinum</i> L.) disponíveis para consulta pública no sistema do Registro Nacional de Cultivares (RNC).....	20
Tabela 2 - Estudos com marcadores moleculares de DNA na cultura do grão-de-bico.....	26
Tabela 3 - Cultivares de grão-de-bico (<i>Cicer arietinum</i>) disponibilizadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).....	28
Tabela 4 - Caracterização de cultivares de grão-de-bico com base em descritores da UPOV.....	38
Tabela 5 - Valores médios, em porcentagem (%), da dominância de cores: azul, celestial, cinza-claro, cinza-escuro, laranja, púrpura, rosa e vermelho de sementes de cultivares de grão-de-bico, obtidos no equipamento GroundEye®.....	43
Tabela 6 - Valores médios, em porcentagem (%), de características de cor: brilho, intensidade, luminosidade, matiz, saturação e textura de sementes de cultivares de grão-de-bico, obtidos no equipamento GroundEye®.	44
Tabela 7 - Valores médios da área (cm ²), circularidade, diâmetro máximo (cm), diâmetro mínimo (cm) e perímetro (cm), de sementes de cultivares de grão-de-bico, obtidos no equipamento GroundEye®.....	45
Tabela 8 - Resultados de identificação (% de acerto e % de erro) de plantas de diferentes cultivares de grão-de-bico, em três épocas de avaliação.....	47
Tabela 9 - Pares de oligonucleotídeos iniciadores (<i>'primers'</i>) polimórficos em cultivares de grão-de-bico.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Croqui de plantas contaminantes na validação da pureza genética de cultivares de grão-de-bico	29
Figura 2 – Dados de temperatura e umidade relativa do ar, no interior da casa de vegetação, entre os meses de junho a outubro de 2023. UFLA, Lavras, MG	30
Figura 3 – Pigmentação por antocianina em cultivares de grão-de-bico do grupo desi.....	37
Figura 4 – Morfologia de folhas de dez cultivares de grão-de-bico	39
Figura 5 - Sementes de cultivares de grão-de-bico avaliadas por meio de análise de imagens, em equipamento GroundEye®, versão S120	43
Figura 6 - Zimograma da isoenzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes de cultivares de grão-de-bico.	51
Figura 7 - Zimograma da isoenzima malato desidrogenase (MDH) em sementes de cultivares de grão-de-bico.	52
Figura 8 - Zimograma da isoenzima catalase (CAT) em sementes de cultivares de grão-de-bico.	53
Figura 9 - Zimograma da isoenzima esterase (EST) em sementes de cultivares de grão-de-bico.	54
Figura 10 - Zimograma da isoenzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de cultivares.....	55
Figura 11 - Zimograma das proteínas de armazenamento em sementes de cultivares de grão-de-bico... ..	57
Figura 12 - Zimograma das proteínas resistentes ao calor em sementes de cultivares de grão-de-bico.	58
Figura 13 - Dendrograma das dez cultivares de grão-de-bico estudadas, obtido pela análise de agrupamento UPGMA, com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando marcadores de proteínas... ..	60
Figura 14 - Zimograma das isoenzimas álcool desidrogenase (ADH); malato desidrogenase (MDH); catalase (CAT); esterase (EST) e superóxido dismutase (SOD) de três cultivares de grão-de-bico, produzidas sob dois níveis de nitrogênio 50 Kg.ha ⁻¹ e 200 kg.ha ⁻¹	61

Figura 15 - Proteínas de armazenamento e resistentes ao calor de três cultivares de grão-de-bico, produzidas sob dois níveis de nitrogênio 50 Kg.ha ⁻¹ e 200 kg.ha ⁻¹	62
Figura 16 - Padrões de bandas observados a partir da amplificação do <i>primer</i> TA-180 em cultivares de grão-de-bico	65
Figura 17 - Padrões de bandas observados a partir da amplificação do <i>primer</i> TA-11 em cultivares de grão-de-bico	66
Figura 18 - Padrões de bandas observados a partir da amplificação do <i>primer</i> TA-203 em cultivares de grão-de-bico	66
Figura 19 - Dendrograma das dez cultivares de grão-de-bico estudadas, obtido pela análise de agrupamento UPGMA, com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, com base na análise de microssatélites	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Aspectos gerais sobre a cultura do Grão-de-bico	14
2.1.1	Características Botânicas.....	14
2.1.2	Composição química dos grãos e sementes	16
2.1.3	Aspectos Econômicos.....	16
3	O Registro Nacional de Cultivares.....	18
3.1	Identificação de cultivares no RNC	19
3.2	Técnicas para avaliação e caracterização de cultivares	21
3.2.1	Marcadores Morfológicos	21
3.2.2	Marcadores de Proteínas	23
3.2.3	Marcadores Moleculares de DNA	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Caracterização morfológica.....	28
4.2	Avaliações de marcadores moleculares de proteínas	32
4.3	Avaliações de marcadores moleculares de DNA.....	34
4.4	Avaliação do polimorfismo	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1	Caracterização de cultivares por meio de marcadores morfológicos.....	36
4.2	Análise de imagens em sementes	42
4.3	Validação da pureza genética	46
4.4	Marcadores moleculares de proteínas.	51
4.5	Marcadores moleculares SSR.....	63
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
6	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

O grão-de-bico (*Cicer arietinum*) é uma das mais importantes leguminosas de grãos alimentares do mundo em termos de cultivo e consumo. No Brasil, a cultura tem se expandido de forma significativa principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste. Assim, a demanda por novas cultivares desta espécie, adaptadas às condições edafoclimáticas do país é iminente. Isto requer investimentos para o desenvolvimento de cultivares, assim como em programas de produção de sementes para atender às demandas dos agricultores.

No Brasil, a produção de sementes está estruturada de acordo com os padrões e normas específicas estabelecidos pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Conforme preconiza a Lei nº 10.711 de 5 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas (Brasil, 2003), as cultivares desenvolvidas para cultivo no país devem ser habilitadas para produção e comercialização de sementes. A lei determina que a produção, o beneficiamento e a comercialização de sementes e mudas fiquem condicionados à prévia inscrição das respectivas cultivares no Registro Nacional de Cultivares (RNC). Este registro objetiva, sobretudo, assegurar a identidade e qualidade do material propagativo para todo o mercado (Brasil, 2003). Para a inscrição de novos materiais junto ao RNC, a portaria MAPA de nº 502, de 20 de dezembro de 2022, que estabelece as normas para inscrição de cultivares e espécies, deve ser consultada.

A caracterização de cultivares é um procedimento essencial utilizado nos sistemas de produção de sementes, que visa certificar e garantir ao agricultor e ao produtor de sementes, lotes com elevada pureza genética (Bonow *et al.*, 2007). Além disso, ressalta-se que o procedimento de identificação de cultivares pode auxiliar na determinação da diversidade genética entre os materiais e, conseqüentemente, no conhecimento da variabilidade existente, fornecendo subsídios aos programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de novas cultivares, as quais devem ser registradas para a habilitação destas para produção e comercialização de sementes (Mir *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2022; Varshney *et al.*, 2013).

Assim, a inscrição no RNC é de fundamental importância em programas de melhoramento, pois além de garantir a identidade genética das cultivares, realiza um controle efetivo, resguardando as cultivares melhoradas contra a contaminação decorrente de misturas varietais, cruzamentos, trocas de nomes ou denominações e outros eventuais erros (Carvalho; Bianchetti; Reifschneider, 2009).

Para o registro de cultivares faz-se necessária a apresentação dos descritores mínimos previstos para as diferentes espécies, com a caracterização dos materiais. O Decreto nº 10.586 e a portaria MAPA nº 502 preconizam que para fins de registro, descritores de características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas ou moleculares, que sejam herdados geneticamente, ou seja, marcadores genéticos, podem ser utilizados para a identificação de cultivares, podendo ser aplicados para habilitação de cultivares no RNC.

Para a cultura do grão-de-bico, segunda maior leguminosa cultivada globalmente, que possui alto valor nutricional e que desempenha um importante papel em garantir a segurança alimentar em diversas regiões do mundo (Kaur; Prasad, 2021; Roorkiwal *et al.*, 2016), verifica-se que o relatório oficial de descritores não está disponível no site do MAPA. Dessa maneira, o desenvolvimento de estudos e pesquisas que visem o levantamento e validação de descritores para identificar e caracterizar as cultivares desenvolvidas no país são de extrema relevância.

Deste modo, esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar descritores morfológicos e marcadores moleculares de proteínas e de DNA, para a distinção e validação de descritores de cultivares de grão-de-bico, visando sobretudo o Registro Nacional de Cultivares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais sobre a cultura do Grão-de-bico

2.1.1 Características Botânicas

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) é uma importante leguminosa pertencente à família Fabaceae, e figura entre as mais importantes leguminosas de grãos alimentares do mundo em termos de cultivo e consumo (Artiaga *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2016; Queiroga; Girão; Albuquerque, 2021).

De acordo com Hegde *et al.* (2018), a Turquia é o principal centro de origem da espécie, e, juntamente com a Índia, representam os dois principais centros de diversidade genética da cultura. O grão-de-bico é caracterizado como uma planta herbácea, de ciclo anual, apresenta sistema de reprodução fundamentalmente autógamo; com frequência de

alogamia em torno de 1%. É diplóide ($2n=16$); apresenta crescimento indeterminado; raiz principal bem desenvolvida e numerosas raízes laterais com presença de nódulos; folhas verde-amareladas, imparipenadas; flores bissexuais, solitárias, sendo cleistogâmicas e autopolinizáveis; e presença de tricomas na maior parte dos seus órgãos vegetativos (Ghribi *et al.*, 2015; Queiroga; Girão; Albuquerque, 2021; Sharma, 1984).

Apesar desta descrição básica de características botânicas, Nascimento (2016) ressalta que há grande diversidade morfológica que pode estar associada aos fatores genéticos e ambientais e/ou pela interação entre estes fatores. Neste contexto, Singh e Diwakar (1995) destacam, por exemplo, que a presença de tricomas glândulares e não glândulares, pode variar de acordo com os genótipos.

Algumas características morfológicas das sementes permitem a divisão desta leguminosa em dois grandes grupos distintos: ‘kabuli’ e ‘desi’, também conhecidos como macrocarpa e microcarpa, respectivamente (Gaur *et al.*, 2010). No grupo ‘kabuli’ encontram-se os materiais com sementes brancas ou bege, tegumento fino e liso, formato de sementes denominado de “cabeça de carneiro” e vagens, folhas e sementes maiores.

Neste grupo, destaca-se a presença de flores de coloração branca e a ausência de pigmentação por antocianina nas plantas. No grupo ‘desi’ tem-se sementes de menor tamanho, de formato angular e superfície áspera, tegumento espesso e coloração muito variável, podendo apresentar tons de amarelo, marrom, verde e preto. Diferentemente do grupo anterior, as hastes das plantas ‘desi’ possuem pigmentação por antocianina e, em geral, suas flores são púrpuras (Bicer; Sakar, 2010; Moreno; Cubero, 1978; Madruga *et al.*, 2021; Nascimento, 2016).

O grão-de-bico do tipo ‘desi’ corresponde de 80 a 85% da área cultivada no mundo (Gaur *et al.*, 2010). Todavia, quando comparado aos materiais do grupo ‘kabuli’ verifica-se que este último grupo possui níveis mais altos de sacarose e níveis mais baixos de fibra, o que por sua vez, são fatores importantes que podem ser levados em conta pelo consumidor. No Brasil, a totalidade dos grãos comercializados e consumidos pertencem ao tipo kabuli (Carvalho *et al.*, 2021).

Ressalta-se que o cultivo do grão-de-bico se adequa de maneira significativa ao sistema de agricultura sustentável, principalmente, por apresentar baixo custo de produção, ampla adaptação à variabilidade climática, sendo considerada uma planta rústica, tolerante ao déficit hídrico. Além disso, é uma ótima alternativa para uso em rotação de culturas e apresenta ótima capacidade de fixar nitrogênio no solo (Araujo *et al.*, 2010; Artiaga *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 1998;).

2.1.2 Composição química dos grãos e sementes

O consumo do grão-de-bico é popular em muitas regiões do mundo, principalmente devido à sua alta qualidade nutricional. A composição química pode sofrer variações bastante significativas devido à fatores ambientais e genéticos (Madurapperumage *et al.*, 2021). A semente de grão-de-bico é composta por proteínas (18-29%), carboidratos (59- 65%), fibras (3-17%), lipídios (4,5 - 6,6%) lignina (2%) e micronutrientes (<1%) (Raza *et al.*, 2019; Wood *et al.*, 2014).

As principais proteínas presentes na semente são globulinas (56%), glutelinas (18%), albuminas (12%) e prolamina (3%), fazendo com que o grão ocupe posição de destaque na qualidade de suas proteínas, quando comparado a outras leguminosas, (Chang *et al.*, 2012; Kaur; Prasad, 2022; Nwokolo; Smartt, 1996;).

O principal carboidrato de reserva nas sementes de grão-de-bico é o amido e a maior parte dos açúcares presentes não é redutor. Com relação aos lipídios, os ácidos linoleico, oleico e palmítico são os principais ácidos graxos presentes na composição química das sementes. Além disso, as sementes são uma boa fonte de cálcio, fósforo, tiamina, riboflavina, niacina e ácido ascórbico, sendo ricas em Ca, Mg, P e, principalmente, K (Nwokolo; Smartt, 1996; Madurapperumage *et al.*, 2021; Wood *et al.*, 2014).

2.1.3 Aspectos Econômicos

O grão-de-bico é a segunda maior leguminosa cultivada globalmente, possui alto valor nutricional e desempenha importante papel em garantir a segurança alimentar em diversas regiões do mundo (Kaur; Prasad, 2021; Roorkiwal *et al.*, 2016). Em termos de consumo, a espécie também ocupa a segunda posição entre as leguminosas de grãos alimentares mais consumidas, ficando atrás apenas da cultura da soja (Nascimento, 2016).

Dados da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), referentes ao ano de 2020, revelam que o grão-de-bico é cultivado em mais de 50 países, sendo a Índia o maior país produtor, atingindo anualmente cerca de 60% da produção global. Depois da Índia, os maiores produtores de grão-de-bico são, respectivamente, Turquia, Paquistão, Etiópia, Mianmar, Rússia, Austrália, Irã, Canadá e Estados Unidos.

A expressiva produção na Índia influencia de maneira bastante considerável para os dados de produção do continente asiático, que é responsável por cerca de 86,7% de toda a produção mundial (FAO, 2021).

No Brasil, a produção de grão-de-bico é considerada primária e incipiente para atender a demanda interna de consumo e, dessa maneira, faz-se necessária a importação de grande volume de grãos para atender o consumo interno (Avelar *et al.*, 2018), cuja demanda é de aproximadamente oito mil toneladas anuais (Queiroga; Girão; Albuquerque, 2021).

Apesar da dependência de importações, o cultivo de grão-de-bico vem se expandindo nos últimos anos no país, devido, principalmente, à disponibilização de novas cultivares e de novas tecnologias de cultivo. Destaca-se que até 2010 não havia registro de áreas produtivas de grão-de-bico no Brasil, fato que corrobora com as constantes necessidades de importações, principalmente, devido à ausência de cultivares adaptadas para a faixa tropical e inexistência de tradição de cultivo por parte dos agricultores (Avelar *et al.*, 2018; Nascimento, 2016; Queiroga; Girão; Albuquerque, 2021).

No Brasil, a partir de 2016 a implementação de novas áreas de cultivo aumentou de maneira significativa, passando de 460 hectares para um total de aproximadamente 10 mil hectares em 2018, acréscimo de aproximadamente 1.000 % na área plantada (Lima Filho, 2019).

Além da evolução da área plantada, deve-se ressaltar que o cultivo da espécie no país tem alcançado produtividades superiores à média mundial. Em relatório de avaliação de tecnologias geradas pela Embrapa, destaca-se que a produtividade da cultivar BRS Aleppo, cultivada na região central, pode atingir até 2.500 quilos por hectare no sistema irrigado e o custo de produção pode ser de 30 a 40% menor que o do feijão, uma das leguminosas mais cultivadas e consumidas no país (Lima Filho *et al.*, 2019). Giordano e Nascimento (2005) verificaram, com a cultivar Cícero, produtividades de 1.600 kg ha⁻¹ e 2.700 kg ha⁻¹ de grãos, nos municípios de Santo Antônio de Goiás-GO e Brasília-DF, respectivamente. Na avaliação de quatro genótipos de grão-de-bico, Paraíso (2019) observou produtividades que variaram de 2.000 a 3.000 kg ha⁻¹ em cultivo de inverno sob sistema irrigado na região Norte de Minas Gerais. Em trabalho anterior nesta mesma região, Hoskem *et al.* (2017) obtiveram produtividade variando de 2.720 a 3.970 kg ha⁻¹ da cultivar Cícero cultivada no mês de junho. Ressalta-se que a produtividade média mundial, conforme dados da FAO é de 965 kg ha⁻¹ (FAOSTAT, 2020).

Destaca-se que o envolvimento de empresas públicas e privadas é de fundamental importância para o desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições edafoclimáticas de cada região, sendo, portanto, essencial o investimento e o fortalecimento dos programas de melhoramento genético e de produção de sementes que são importantes ferramentas para viabilizar o cultivo do grão-de-bico no país (Artiaga *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2016).

Assim, a cultura é promissora e os investimentos em políticas públicas que visem o crescimento e difusão da cultura no país podem fornecer subsídios para organização e consolidação da cadeia produtiva. A articulação com os órgãos do Estado também se torna cada vez mais essencial na busca por soluções para os gargalos do setor produtivo da cultura (Lima Filho *et al.*, 2019). Não há dúvidas de que o desenvolvimento de cultivares adaptadas no país e o registro nacional destas sejam fundamentais para viabilizar a produção de sementes no país, atendendo as demandas do mercado e dos agricultores.

2.2 O Registro Nacional de Cultivares

No Brasil, a produção de sementes está estruturada de acordo com os padrões e normas específicas estabelecidos pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Conforme preconiza a Lei nº 10.711 de 5 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças (Brasil, 2003), as cultivares desenvolvidas para cultivo no país devem ser habilitadas para produção e comercialização de sementes. E as normas para a inscrição de cultivares e de espécies no Registro Nacional de Cultivares estão estabelecidas na portaria MAPA de nº 502 de 19 de outubro de 2022.

A lei determina que a produção, o beneficiamento e a comercialização de sementes e mudas ficam condicionados à prévia inscrição das cultivares no Registro Nacional de Cultivares (RNC). Este registro objetiva, sobretudo, assegurar a identidade e a qualidade do material propagativo para todo o mercado consumidor (Brasil, 2003). O RNC é de fundamental importância para os programas de melhoramento, pois, além de garantir a identidade genética das cultivares, realiza um controle efetivo, resguardando as cultivares melhoradas contra a degradação decorrentes de contaminações varietais, cruzamentos, trocas de nomes ou denominações e outros eventuais erros acidentais (Carvalho; Bianchetti; Reifschneider, 2009).

Amparado na antiga Lei de Sementes, lei nº 6.507, de 19 de dezembro de 1977 (regulamentada pelo decreto nº 81.771, de 7 de junho de 1978), o Registro Nacional de Cultivares (RNC) foi criado para garantir e estabelecer que o uso das espécies agrícolas, cultivares ou híbridos, que deveriam ser previamente aprovados pela entidade certificadora/fiscalizadora (Carvalho; Bianchetti; Reifschneider, 2009). Dessa maneira, a avaliação era realizada de forma cooperada e colaborativa entre instituições de pesquisa, tanto públicas, quanto privadas e as comissões estaduais eram responsáveis por definir os ensaios agronômicos, listas de recomendações de cultivares e propor sua aprovação junto ao Ministério da Agricultura. Destaca-se que o início legal do RNC suscitou a criação das portarias nº 178, de 21 de julho de 1981, que instituiu o Sistema Brasileiro de Avaliação e Recomendações de Cultivares, e nº 271, de 06 de outubro de 1982, que fundou o Sistema Brasileiro de Registro de Cultivares (Carvalho; Bianchetti; Reifschneider, 2009; Costa *et al.*, 2007;).

Atualmente, o RNC está regido pela Lei nº 10.711, de 05 de agosto de 2003 e regulamentado pelo decreto nº 10.586, de 18 de dezembro de 2020, em substituição ao decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004, e pela portaria MAPA nº 502 de 19 de outubro de 2022.

2.2.1 Identificação de cultivares no RNC

Para as cultivares serem registradas no RNC é preciso serem distintas de outras cultivares e os descritores utilizados para essa distinção devem ser homogêneos e estáveis (Brasil, 2022).

Estas avaliações são realizadas por meio de ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) que são pré-estabelecidos para algumas espécies vegetais. Estes ensaios podem ser definidos como o valor intrínseco da combinação das características agronômicas da cultivar com as suas propriedades de uso, seja em atividades agrícolas, industriais, comerciais e de consumo '*in natura*' (Brasil, 2022).

Vale ressaltar que além dos ensaios de VCU, existem testes agronômicos para fins de inscrição de cultivares de espécies para as quais o Ministério da Agricultura ainda não tenha estabelecido os parâmetros mínimos para a realização de ensaios de VCU, estes por sua vez, podem ser denominados de ensaios de adaptação (Brasil, 2020).

De maneira geral, os ensaios de VCU e de adaptação são protocolos importantes na produção de sementes, pois certificam que cultivares registradas foram previamente

testadas, transmitindo, portanto, maior confiabilidade para o agricultor.

Além dos ensaios agronômicos, ainda se faz necessária a apresentação dos descritores mínimos previstos para as diferentes espécies, com a caracterização das cultivares. O Decreto nº 10.586 estabelece que para fins de registro, descritores de característica morfológica, fisiológica, bioquímica ou molecular que seja herdada geneticamente, podem ser utilizados para a identificação de cultivares, podendo ser aplicados para fins de registro e proteção.

Por meio dos dados levantados até o dia 12 de janeiro de 2024, no cadastro de cultivares inscritas do RNC, verifica-se que existem 11 cultivares de grão-de-bico registradas (Tabela 1). Atualmente, a Embrapa é a maior detentora com seis cultivares de grão-de-bico devidamente registradas (MAPA, 2022). O número de cultivares disponíveis poderia ser maior com a presença da cultivar denominada ‘Leopoldina’, desenvolvida na década de 1990 pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), entretanto, não há sementes disponíveis desta cultivar no mercado (Nascimento, 2016).

Tabela 1 – Lista de cultivares de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) disponíveis para consulta pública no sistema do Registro Nacional de Cultivares (RNC).

Denominação	Mantenedor	Nº de Registro	Data de Registro
Amã	ISLA SEMENTES LTDA	47644	23/03/2021
Apu	ISLA SEMENTES LTDA	42990	24/03/2020
BRS Aleppo	EMBRAPA	33233	17/10/2014
BRS Cristalino	EMBRAPA	35794	20/09/2016
BRS Hari	EMBRAPA	52533	26/08/2022
BRS Kalifa	EMBRAPA	41748	17/12/2019
BRS Toro	EMBRAPA	36756	09/05/2017
Cícero	EMBRAPA	12100	25/07/2002
IAC Marrocos	INSTITUTO AGRONÔMICO - IAC	01728	22/04/1999
GB Cappucino	OSMAR PEREIRA ARTIAGA	54046	18/01/2023
GB Zeus	OSMAR PEREIRA ARTIAGA	54126	27/01/2023

Fonte: Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Data de acesso: 12 de janeiro de 2024.

Disponível em: <https://tinyurl.com/39vpjkbx>

Existem outras cultivares em processo de registro proteção junto ao Ministério da Agricultura que deverão impulsionar o mercado do grão-de-bico no país (Lima Filho *et al.*, 2019).

2.3 Técnicas para avaliação e caracterização de cultivares

A caracterização de cultivares é um procedimento essencial utilizado nos sistemas de produção de sementes, que tem por objetivo checar e garantir ao agricultor e ao produtor de sementes, lotes com elevada pureza genética (Bonow *et al.*, 2007; Kosmowski; Worku, 2018). Ademais, ressalta-se que o procedimento de identificação de cultivares pode auxiliar a determinação da diversidade genética entre os materiais e, conseqüentemente, no conhecimento da variabilidade existente.

Aliado a esses fatores, a descrição das características encontradas em um determinado genótipo pode possibilitar a sua classificação comercial e a identificação de características desejáveis e, fornecer, portanto, subsídios aos programas de melhoramento genético, oportunizando a utilização, com mais eficiência, do germoplasma disponível, além de fortalecer a sua conservação (Costa *et al.*, 2020; Bellemou *et al.*, 2020; Biswal *et al.*, 2021). Não menos importante, a identificação e caracterização de cultivares é fundamental para o Registro Nacional de Cultivares (RNC). Neste viés, ressalta-se que a identificação de cultivares adquire importância técnica e econômica, e possui relevância tanto para a pesquisa científica, quanto para o comércio e para políticas agrícolas (Kosmowski; Worku, 2018).

Para as cultivares de grão-de-bico que possuem registro no RNC do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, verifica-se que o relatório oficial de descritores não está disponível. Dessa maneira, o desenvolvimento de estudos e pesquisas que visem validar descritores para identificar e caracterizar as cultivares desenvolvidas no país são de extrema relevância.

A caracterização de cultivares geralmente é feita utilizando marcadores morfológicos, bioquímicos (isoenzimáticos) ou moleculares, cada um com suas vantagens e desvantagens comparativas (Bonow *et al.*, 2007; Carvalho 2004; Vicente *et al.*, 2005). Os marcadores têm a função de identificar ou 'etiquetar' características específicas (Ramalho *et al.*, 2012)

2.3.1 Marcadores Morfológicos

Os marcadores morfológicos podem ser entendidos como um fenótipo de fácil identificação que, geralmente, são determinados por um único alelo e que possuem alta herdabilidade (Ramalho *et al.*, 2012). No Brasil, marcadores morfológicos em sementes,

plântulas e plantas nas fases de florescimento e maturação são bastante utilizados para a identificação de cultivares e certificação da pureza genética (Silva, 1998). Além de serem os mais usuais, deve-se ressaltar que a análise das características morfológicas é um método direto, altamente visual, de fácil execução, sendo uma importante ferramenta, do ponto de vista prático para a identificação de plantas atípicas em um campo de produção de sementes, por exemplo (Andrade, 2012; Keneni *et al.*, 2012; Pakseresht *et al.*, 2013).

Na literatura é possível verificar que genótipos de grão-de-bico possuem grande diversidade morfológica, apresentam variações na arquitetura da planta, hábito de crescimento, forma da semente, cor do tegumento, coloração de flores e plantas, comportamento fenológico e tolerância a estresses bióticos e abióticos (Duranti; Gius, 1997; Bakhsh; Arshad; Haqqani, 2006; Malik *et al.*, 2010; Farooq *et al.*, 2017).

Upadhyaya (2003) ao avaliar a variação fenotípica da coleção de grão-de-bico do ICRI (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) em diferentes regiões geográficas, observou variações no padrão de cor da flor, cor da semente, formato e superfície da semente, teor de antocianina e variações quanto à resistência à murcha de fusarium. Em 45 genótipos de grão-de-bico dos tipos desi e kabuli, Janghel *et al.* (2021) observaram características agromorfológicas altamente variáveis, a saber: número de ramos secundários, número de vagens, peso de 100 sementes, rendimento de sementes e porcentagem de germinação. Biswal *et al.* (2021) também observaram grande variação da cor do tegumento, tamanho da semente, altura da planta, dias para floração e hábito de crescimento. Apesar da relevância e predominância de uso dos marcadores morfológicos, deve-se mencionar que a caracterização de cultivares por este método apresenta algumas limitações. Caracteres morfológicos são usados com sucesso na identificação de plantas até o nível de gênero e espécie, no entanto, podem não ser eficientes em alguns casos para o nível varietal (Joshi *et al.*, 2018). Ademais, devido à significativa influência do ambiente sobre as características fenotípicas, podem surgir possíveis imprecisões nos resultados, diminuindo sua precisão. Além disso, a diferenciação de genótipos muito similares pode ser difícil (Bonow *et al.*, 2007; Keneni *et al.*, 2012, Pakseresht *et al.*, 2013). Também podem demandar extensas áreas e os descritores para distinção estarem presentes no final do ciclo da cultura o que demanda mais tempo.

Dessa maneira, a utilização de marcadores moleculares se apresenta como uma alternativa importante e complementar.

2.3.2 Marcadores Moleculares de Proteínas

O uso de marcadores moleculares de proteínas é considerado uma importante técnica para diferenciação e identificação de cultivares, recomendados pelas regras da ISTA (*International Seed Testing Association*) e pela UPOV (*Union for the Protection of New Varieties of Plants*) (Brasil, 1997; Vieira *et al.*, 2009).

Os marcadores de proteínas podem ser de proteínas de armazenamento, constitutivas ou com atividade catalítica, estas últimas denominadas enzimas. As enzimas podem ser separadas por meio de variados procedimentos bioquímicos tais como cromatografia, sedimentação, eletroforese e sorologia (Vieira *et al.*, 2009) de acordo com o seu peso molecular e sua cinética. Entre os métodos citados, o da eletroforese em gel é o mais versátil e facilmente aplicável ao estudo de variações individuais em vegetais. O princípio da utilização da técnica de eletroforese, conforme Murphy *et al.* (1990), fundamenta-se nas diferenças de mobilidade das proteínas sob um campo elétrico, que são resultado de dessemelhanças nas sequências de nucleotídeos do DNA que codificam as proteínas.

Como vantagens da utilização de técnicas de eletroforese de proteínas, destaca-se a rapidez de execução e de obtenção dos resultados, o fornecimento de ampla informação genética, uso de técnicas de custo relativamente baixo e grande flexibilidade na utilização dos materiais para análise, que podem contemplar diferentes materiais, em diferentes fases de desenvolvimento, tais como sementes, plântulas, raízes, folhas, pólen e outros tecidos (Bonow *et al.*, 2007; Ferreira; Grattapaglia, 1998; Marcon, 1986). Neste contexto, o uso de técnicas eletroforéticas de proteínas têm sido sugeridas na identificação de cultivares e certificação da pureza genética por se tratar de um teste rápido e demandar pouco espaço físico (Vieira *et al.*, 2009).

Muitas proteínas têm sido úteis para a separação de genótipos de grão-de-bico e de outras espécies de plantas. Marcadores moleculares de proteínas mostraram-se eficientes na caracterização de cultivares de soja, sendo recomendados juntamente com os descritores morfológicos, no estudo de identificação de cultivares (Vieira *et al.*, 2009).

Hameed *et al.* (2009) obtiveram êxito na diferenciação de genótipos de grão-de-bico por meio de proteínas de armazenamento em sementes, avaliadas pela técnica de eletroforese. Kaur *et al.* (2012), ao avaliar 27 genótipos de grão-de-bico, sendo 20 tolerantes ao frio e sete sensíveis, por meio das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutatona redutase, ascorbato peroxidase e catalase), teor de H₂O₂ e malondialdeído,

enzimas envolvidas no metabolismo do fosfato (fosfatase ácida e alcalina) e teor de ácido fítico. Observaram que a superóxido dismutase (SOD) e a ascorbato peroxidase (APX) podem ser marcadores promissores para a distinção de cultivares para esta característica.

Os resultados do trabalho de Kaur *et al.* (2012) foram semelhantes aos encontrados por Kumar *et al.* (2011) por meio dos quais, observaram que em genótipos de grão-de-bico tolerantes ao frio há níveis mais elevados de superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase, em comparação com genótipos suscetíveis.

As proteínas da família HSP (*heat shock protein*) são uma classe de proteínas que desempenham um papel crucial na proteção e na resposta celular ao estresse térmico e a outros tipos de estresse celular, como estresse oxidativo, choque térmico, entre outros. Elas são conhecidas por sua capacidade de atuar como chaperonas moleculares, auxiliando no correto dobramento de outras proteínas, bem como na sua degradação quando necessário (Aquino *et al.*, 2023; Ramakrishna *et al.*, 2022)

Em condições de estresse térmico, como altas temperaturas, as células podem produzir mais HSP como uma resposta adaptativa para ajudar a proteger as proteínas da desnaturação e promover sua estabilidade (Yadav *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2013). Essas proteínas são, portanto, conhecidas como proteínas resistentes ao calor. Sua importância é evidenciada pelo fato de que são altamente conservadas ao longo da evolução e estão presentes em praticamente todos os organismos (Ramakrishna *et al.*, 2022).

Proteínas resistentes ao calor têm sido sugeridas como marcadores estáveis para a caracterização e diferenciação de cultivares (Silva-Mann *et al.*, 2004). No estudo de Gu *et al.* (2012), um gene LEA foi isolado de diferentes tecidos de plantas de grão-de-bico. Como resultado, os autores verificaram a presença da proteína em folhas de plântulas, caules, raízes, flores, vagens jovens e sementes jovens. Proteínas de armazenamento também têm sido utilizadas para a caracterização de cultivares. A diversidade genética de proteínas de armazenamento de sementes foi relatada para feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) (LIOI *et al.*, 1999), feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Ferreira *et al.*, 2000) e grão-de-bico (*Cicer arietinum*) (Ghafoor *et al.*, 2003).

As isoenzimas podem ser entendidas como produtos da ação gênica. O termo isoenzima faz referência as diferentes formas moleculares que uma determinada enzima pode apresentar, porém, exibem a mesma afinidade e especificidade com o substrato (Market; Moller, 1959).

Isoenzimas álcool desidrogenase (ADH) também já foram analisadas para a cultura do grão-de-bico. No trabalho de Gomes *et al.* (1982) foram relatadas algumas propriedades

de três isoenzimas de ADH e as variações quantitativas e qualitativas dessas isoenzimas durante a germinação de sementes da espécie.

No entanto, os marcadores de proteínas também apresentam limitações. Podem ser afetados por condições ambientais como temperatura, luz, nutrição e também são influenciados pela fenologia da planta, estádios de maturidade e crescimento, tempo de armazenamento de sementes, ou até mesmo pela presença de microrganismos no material a ser estudado (Brandão Junior, 1996; Catão *et al.*, 2016; Imolesi *et al.*, 2001; Imtiaz *et al.*, 2008).

No contexto de alterações via fatores ambientais, um importante ponto a ser destacado é que as principais proteínas presentes no grão-de-bico, sendo globulinas, glutelinas, albuminas e prolamina, podem ser afetadas por diferentes níveis de adubação mineral (Singh; Matta, 2005). Na literatura verifica-se, por exemplo, que há um aumento da intensidade da expressão isoenzimática, quando há o aumento de doses de nitrogênio (Barbosa *et al.*, 2022; Imolesi *et al.*, 2001).

2.3.3 Marcadores Moleculares de DNA

Diante de tais limitações, os marcadores moleculares com base no DNA são ferramentas consideradas extremamente úteis e eficientes para a caracterização de cultivares e determinação da pureza genética, uma vez que não são influenciados pelas condições ambientais e pelo estágio fenológico da planta, sendo considerados mais seguros e precisos (Lanza *et al.*, 2000; Yadav *et al.*, 2022).

Os marcadores de DNA começaram a ser utilizados na década de 1980 e, atualmente, estão disponíveis diversas metodologias para avaliação genética de cultivares. Uma das principais vantagens do uso de marcadores moleculares de DNA reside no fato de que é possível observar grande variabilidade entre os indivíduos de uma espécie, o que equivale dizer que utilizando o DNA consegue-se identificar importante polimorfismo (Yildirim, *et al.*, 2024).

Vários tipos de marcadores de DNA estão disponíveis para a avaliação genética de cultivares e, dentre os mais comuns estão: o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*); RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*); SSR (*Simple Sequence Repeat*, também conhecido como microsatélite); e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Ramalho *et al.*, 2012). Esses

marcadores moleculares, conforme Sharma *et al.* (2022), são comumente usados na identificação de uma característica específica, bem como em programas de melhoramento. Na cultura do grão-de-bico, os autores ressaltam que os marcadores têm sido amplamente utilizados para caracterização de genótipos, em análises de diversidade e relação genética entre espécies. Para a cultura do grão-de-bico vários marcadores têm sido usados para finalidades diversas, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Estudos com marcadores moleculares de DNA na cultura do grão-de-bico.

Tipos de marcadores	Aplicações no grão-de-bico	Referências
RAPD	Variações genéticas em cultivares, filogenia, marcação de genes, biologia evolutiva	Gupta e Bhagyawant (2021); Gautam <i>et al.</i> (2018); Talebi <i>et al.</i> (2008); Cobos <i>et al.</i> , (2005); Winter <i>et al.</i> , (2000); Cho <i>et al.</i> (2002); Singh <i>et al.</i> (2003); Sant <i>et al.</i> (1999).
RFLP	Diversidade genética de cultivares	Maatallah <i>et al.</i> , (2002); Serret <i>et al.</i> (1997); Udupa <i>et al.</i> (1993); Van Rheenen, (1993);
SSR	Diversidade genética e as relações entre cultivares e espécies.	Mir <i>et al.</i> (2022); Gupta <i>et al.</i> (2017); Vural <i>et al.</i> (2010); Seyedimoradi <i>et al.</i> (2019); Afzal <i>et al.</i> (2018); Hajibarat <i>et al.</i> (2015); Ghaffari <i>et al.</i> (2014); Khamassi <i>et al.</i> (2012); Sethy <i>et al.</i> (2006).
AFLP	Diversidade genética entre cultivares	Khan <i>et al.</i> (2016); Wood <i>et al.</i> (2011); Talebi <i>et al.</i> (2008); Singh; Singhal; Randhawa (2008); Nguyen <i>et al.</i> (2004); Singh <i>et al.</i> (2003); Winter <i>et al.</i> , (2000).

Fonte: Adaptado de Sharma *et al.* (2022).

Apesar da alta eficiência dos diferentes marcadores moleculares na análise da diversidade genética, a escolha pode depender de fatores como custo, facilidade de operação e reprodutibilidade, polimorfismo e da herança dominante/codominante (Sharma *et al.*, 2022; Singh; Singhal; Randhawa, 2008; Ramalho *et al.*, 2012).

Como o grão-de-bico possui cleistogamia, mecanismo que permite a autofecundação antes de ocorrer a abertura da flor, quando da utilização dos marcadores RFLP e RAPD nos trabalhos de Van Rheenen *et al.* (1993) e Udupa *et al.* (1993) foi observado relativamente pouca diversidade genética entre cultivares. Resultado similar foi

encontrado por Singh *et al.* (2003), que em avaliações de diversidade genética com 78 *primers* RAPD, apenas 20 houve polimorfismo entre as cultivares de grão-de-bico. Dessa maneira, o baixo grau de variação genética detectado pelos marcadores RFLP e RAPD no grão-de-bico pode limitar o mapeamento de grande número desses marcadores em um dado cruzamento, por exemplo (Singh; Singhal; Randhawa, 2008).

Na literatura, verifica-se que os marcadores SSR são mais utilizados para estudos do genoma para a cultura do grão-de-bico. Singh, Singhal e Randhawa (2008) ressaltam que o desenvolvimento de marcadores SSR acelerou a genômica do grão-de-bico e ofereceu subsídios em estudos relacionados às características agrônômicas da espécie. Os autores salientaram também que os marcadores SSR estão disponíveis para o genoma completo do grão-de-bico, principalmente, devido ao desenvolvimento e mapeamento de várias centenas destes marcadores, em populações intra e interespecíficas.

Sethy *et al.* (2006) verificaram que os marcadores SSRs são abundantes no genoma do grão-de-bico e podem ser usados eficientemente para detectar variação genética no nível intra-específico. Essa eficiência também foi relatada no trabalho de Bellemou *et al.* (2020), ao utilizarem 11 marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética entre 46 genótipos de grão-de-bico, verificaram que os marcadores SSR podem ser uma ferramenta útil para estudos da diversidade genética do grão-de-bico e em programas de melhoramento.

Os marcadores ISSR e SSR são bem conhecidos em plantas por seus usos, pois permitem o exame de polimorfismo em microssatélites e intermicrossatélites sem ter um entendimento completo da sequência de DNA (Sharma *et al.*, 2022).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na área experimental e no Laboratório Central de Pesquisa em Sementes (LCPS), do Departamento de Agricultura (DAG) da Escola de Ciências Agrárias de Lavras (ESAL) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, localizado na região Sul de Minas Gerais.

Foram utilizadas sementes de 10 cultivares de grão-de-bico provenientes da Embrapa Hortaliças, Unidade Descentralizada da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, vinculada ao Ministério da Agricultura e Pecuária, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Cultivares de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) disponibilizadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Cultivar	Grupo	Genitores
BRS Kalifa	Kabuli	(CNPH 035 x CNPH 083) x GB 3827
BRS Cícero	Kabuli	-
BRS Toro	Kabuli	(CNPH 007 x CNPH 043) x GB 0528,
BRS Aleppo	Kabuli	X99TH104/FLIP84-11 x S95082
BRS Cristalino	Kabuli	(CNPH 035 x CNPH 102) x GB 0528,
10108	Desi	-
BRS Hari	Desi	-
10209	Desi	-
UPL 05	Desi	-
UPL 06	Desi	-

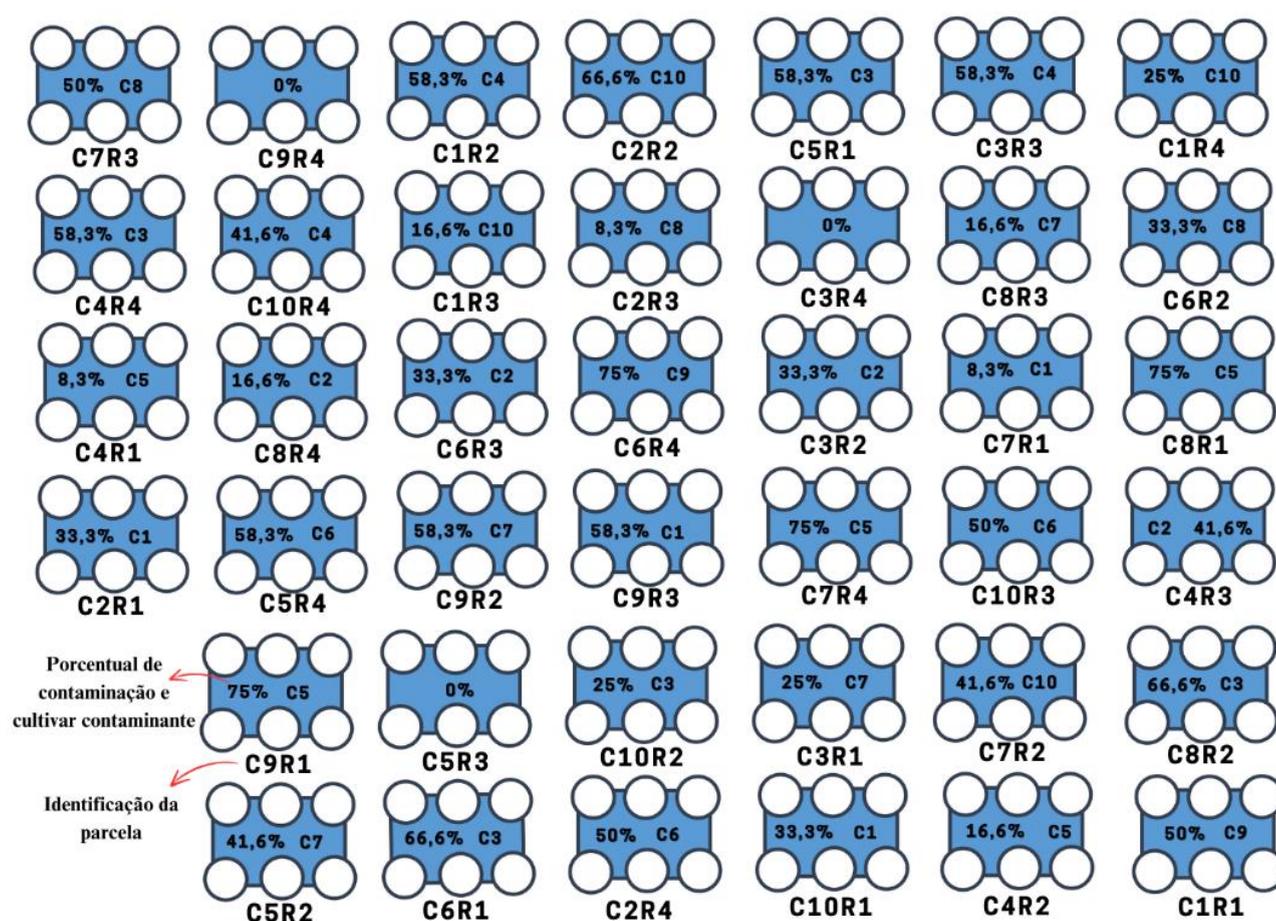
Fonte: Do autor (2024).

3.1 Caracterização morfológica

Com o objetivo de verificar a possibilidade de diferenciação entre as diferentes cultivares por meio de características morfológicas, foi instalado um experimento em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), durante o período de junho a outubro de 2023. Foram utilizadas sementes de 10 cultivares, as quais foram produzidas nas mesmas condições edafoclimáticas na área experimental do Departamento de Agricultura, Setor de Olericultura, na safra 2022/2023. A semeadura foi realizada em vasos plásticos com capacidade para 25 L. Utilizou-se a mistura de 3:2:1 de solo, substrato vegetal

e areia, respectivamente. Os tratamentos foram constituídos pelas cultivares, com quatro repetições e valores de 0% a 75% de contaminação de uma segunda cultivar, dentro das repetições. Cada repetição foi composta por seis vasos. Foram semeadas oito sementes por vaso, sendo realizado posteriormente o desbaste, mantendo-se duas plantas por vaso. O controle dos tratamentos no experimento foi feito por meio de um croqui com a posição e a porcentagem relativa das plantas contaminantes (Figura 1). Realizou-se a aleatorização do nível de contaminação e da cultivar contaminante dentro das parcelas.

Figura 1 – Croqui de plantas contaminantes na validação da pureza genética de cultivares de grão-de-bico.



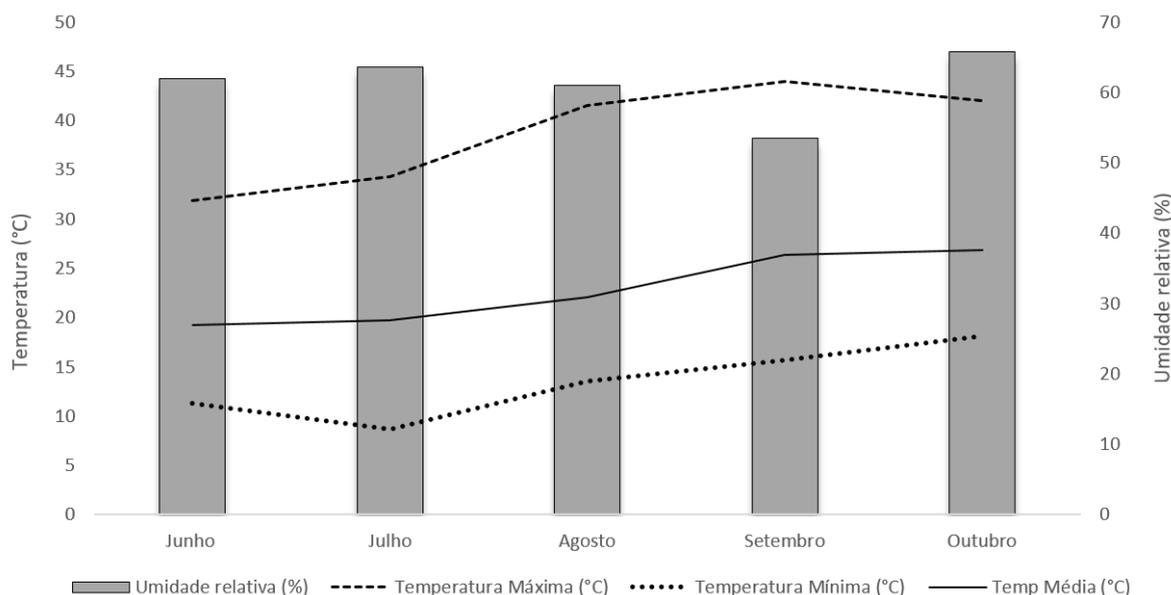
Cultivares: C1 - 'BRS Kalifa', C2 - 'BRS Cícero', C3 - 'BRS Toro', C4 - 'BRS Aleppo', C5 - 'BRS Cristalino', C6 - '10108', C7 - 'BRS Hari', C8 - '10209', C9 - 'UPL05' e C10 - 'UPL06'

Fonte: Do autor (2024).

A irrigação e as adubações foram realizadas conforme recomendações de Nascimento *et al.*, (2016). Os dados de temperatura do ar (°C) e da umidade relativa do ar (%) no interior da casa de vegetação (Figura 1), foram obtidos por meio do dispositivo

eletrônico datalogger, modelo AK170.

Figura 2 - Dados de temperatura e umidade relativa do ar no interior da casa de vegetação, entre os meses de junho a outubro de 2023. UFLA, Lavras, MG.



Fonte: Do autor (2024).

As identificações das cultivares, em cada tratamento, foram feitas por quatro avaliadores, especialistas na área de sementes, que desconheciam a porcentagem das contaminações existentes. Para cada cultivar, foram utilizadas plantas as que foram desenvolvidas concomitante às dos demais tratamentos, em vasos no mesmo ambiente em casa de vegetação para auxiliar os avaliadores na identificação dos contaminantes. As plantas foram avaliadas individualmente e o avaliador apontava aquelas julgadas como contaminantes.

As avaliações foram realizadas aos 40, 100 e 140 dias após a semeadura, representando os estádios vegetativo, reprodutivo/florescimento e a pré-colheita, respectivamente. Foram calculadas as porcentagens de acerto e erro com base nos resultados obtidos das avaliações. A porcentagem de acerto foi calculada pelo quociente entre frequência observada e a frequência esperada, multiplicado por cem.

No cálculo da porcentagem de erro foram consideradas as plantas contaminantes que não foram identificadas pelos avaliadores e as não contaminantes que foram identificadas como contaminantes. O somatório dessas plantas foi dividido pelo número

total de plantas na parcela e multiplicado por 100.

Foi calculado o desvio padrão da média dos resultados considerando as quatro repetições, obtidos pelos quatro avaliadores conforme Pimentel Gomes (1987). Para verificar a significância dos desvios entre os resultados obtidos pelos avaliadores foi utilizado o teste de qui-quadrado (χ^2).

Nesse teste, os desvios foram transformados em um único valor de χ^2 , representando a medida padronizada da magnitude dos desvios (Ramalho *et al.*, 2012).

O valor de χ^2 foi estimado pela seguinte expressão:

$$\chi^2 = \sum (F_o - F_e)^2 / F_e$$

- F_o : frequência observada de plantas contaminantes

- F_e : frequência esperada de plantas contaminantes

Os dados de frequência esperada e observada foram obtidos pelas médias das quatro repetições, para cada avaliador.

Durante as avaliações, foram considerados os descritores morfológicos recomendados pela União para a Proteção das Obtenções Vegetais (UPOV) para a cultura do grão-de-bico, sendo observadas as seguintes características: hábito de crescimento, ramificação, presença de antocianina no caule, intensidade da cor verde nas folhas, tipo de folha, cor da flor, cor da semente, intensidade da cor da semente, forma e nervuras das sementes, tempo para florescimento, tamanho da vagem, peso de sementes e tempo para maturação.

Adicionalmente aos descritores citados acima, utilizou-se o sistema GroundEye®, versão S120, para a caracterização das sementes com o intuito de verificar a eficiência do sistema na distinção das cultivares. Por meio da análise de imagens, foram quantificadas as características das sementes quanto à textura média, dominância de cor (preta, azul, celestial, cinza-escuro, cinza-claro, laranja, púrpura, rosa e vermelho), quanto às porcentagens das características de cor (matiz, brilho, intensidade, luminosidade e saturação) e à geometria (área, circularidade, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e perímetro).

Para análise estatística dos dados, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. As características relacionadas aos fatores quantitativos dos descritores e das sementes, quanto a dominância, cor e geometria, foram submetidos à

análise de variância e, quando significativos, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico “R”.

3.2 Avaliações de marcadores moleculares de proteínas

Foram analisadas proteínas de sementes das cultivares ‘BRS Aleppo’, ‘BRS Cristalino’, ‘BRS Kalifa’, ‘BRS Toro’, ‘Cícero’, ‘10108’, ‘BRS Hari’, ‘10209’, ‘UPL05’ e ‘UPL06’. Conforme recomendações de Konarev e Gavriljuk (1988), foram amostradas 50 sementes de cada cultivar e trituradas em moinho, com adição de nitrogênio líquido, polivinil pirrolidona (PVP). Após a obtenção de um pó bem fino, as amostras foram armazenadas a -80 °C.

Com o objetivo de verificar a influência de fatores ambientais sobre a expressão de proteínas visando a identificação de cultivares, sementes foram produzidas sob dois níveis de adubação. Em esquema de parcelas subdivididas, sementes das cultivares ‘BRS Aleppo’, ‘BRS Kalifa’ e ‘BRS Toro’ foram multiplicadas no Setor de Olericultura do Departamento de Agricultura da UFLA, entre os meses de agosto e janeiro de 2022. Cada parcela contou com quatro metros de comprimento e 50 centímetros de espaçamento entre linhas e densidade de 10 plantas por metro linear, conforme recomendações de plantio de Nascimento *et al.* (2016).

Nas subparcelas foram utilizados dois diferentes níveis de nitrogênio, 50 kg.ha⁻¹ e 200 kg.ha⁻¹ conforme Barbosa *et al.* (2022), aplicados em cobertura, 30 dias após a emergência. Todas as recomendações de manejo foram realizadas conforme Nascimento *et al.*, (2016).

Para análises eletroforéticas de isoenzimas, utilizou-se o método Nativa PAGE. Amostras contendo 100 mg de sementes moídas passaram por uma lavagem para delipidação. Em cada microtubo foram adicionados 300 µL de água destilada e 300 µL de éter etílico. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e deixadas de repouso em geladeira por 1 hora. Em seguida, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C, e, após este processo, retirou-se o sobrenadante para posterior aplicação do tampão de extração.

Para a extração das isoenzimas, foi utilizado o tampão Tris-HCl 0,2M pH 8e 0,1% de β-mercaptoetanol, na proporção de 250 µl por 100 mg de sementes previamente trituradas. A mistura foi homogeneizada em vortex e mantida overnight a 4 °C e

posteriormente, centrifugada a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 50 µL do sobrenadante da amostra e a corrida efetuada a 150 V, por seis horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados para os sistemas: álcool desidrogenase (ADH), catalase (CAT), esterase (EST), malato desidrogenase (MDH) e superóxido desmutase (SOD), em replicatas técnicas, conforme metodologias descritas por Alfenas (2006).

Para a análise eletroforética de proteínas de armazenamento, utilizou-se o método SDS-PAGE, conforme protocolo de Vieira (2000). Para as proteínas de armazenamento, utilizou-se o tampão borato 0,02 M pH 9,0 juntamente com tampão desnaturante (0,02 M de Tris HCl pH 8,6; 1% de SDS; 0,3% de β- mercaptoetanol; 8,3% de glicerol).

As amostras extraídas foram agitadas por 10 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Foram adicionados 750 µL de tampão desnaturante ao sobrenadante, sendo as amostras aquecidas a 90°C por dois minutos. Para preparar as amostras foram adicionados 40µL de tampão da amostra em 10µL de extrato protéico. O tampão da amostra utilizado consistiu em 5 mL de glicerol; 0,5M de Tris-HCl 0,4% de SDS pH 8,0; 0,5 mL de β-mercaptoetanol e 2,5 mg de azul de bromofenol. Foram aplicados nos géis 40µL de cada amostra e 10µL de padrão de peso molecular de proteínas, variando de 10 a 200 kDa em gel de poliacrilamida 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A eletroforese e a revelação dos géis foram realizadas de acordo com o protocolo desenvolvido por Alfenas (2006).

Para a extração de proteínas resistentes ao calor utilizou-se o tampão de extração constituído de 50 mM de Tris HCl pH 7,5; 500 mM de NaCl; 5 mM de MgCl₂ e 1 mM de PMSF. Para cada 100 mg de amostra foram adicionados 1000 µL do tampão de extração. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 30 minutos, a 4°C e o sobrenadante incubado em banho-maria a 85°C por 15 minutos. Foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições citadas e o sobrenadante foi coletado. Foram adicionados 40µL de tampão da amostra constituído de Tris-HCl 0,5M pH 7,5; 12,5% de glicerol; 2,3% de SDS e 0,1% de azul de bromofenol em 70 µL de extrato protéico. O tampão da amostra e o extrato proteico foram transferidos para microtubos com pequenos orifícios na tampa e em seguida, imersos em água fervente por cinco minutos. Foram aplicados 50 µL de cada amostra no gel. A eletroforese e revelação dos géis foi realizada como descrito anteriormente para a análise de proteínas de armazenamento.

3.3 Avaliações Moleculares de DNA

Para a extração do DNA, amostras de folhas foram coletadas de cada cultivar, no estágio vegetativo, 30 dias após a semeadura e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram pesados 400 mg das amostras e adicionadas a microtubos de 2 mL. O tecido foi triturado utilizando o homogeneizador Tissue Lyser (LT) a 50 Hz em intervalos de 15 segundos, para adição de nitrogênio líquido, totalizando 120 segundos. Após a obtenção de um pó bem fino, foram adicionados 600 μL CTAB 2% (CTAB 2%; 1M Tris-HCl pH 7,5; 0,5mM de EDTA pH 8,0; NaCl 5M) com adição de 2% de β - mercaptoetanol. As amostras foram incubadas a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 40 minutos em ThermoMixer® em agitação constante e, em seguida, mantidas overnight a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao final deste período, às amostras foram adicionados 400 μL de clorofórmio, que foram invertidos por 5 minutos para a obtenção de uma emulsão que, posteriormente, foi centrifugada por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 13.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se o isopropanol a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, na proporção de 1:1 para a precipitação dos ácidos nucleicos. As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores, à 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado para o processo de lavagem que consistiu da adição de 200 μL de etanol 70% seguida de centrifugação. Este processo foi realizado duas vezes e em seguida, realizou-se a eliminação do álcool etílico. O precipitado foi seco por 30 minutos e então foram adicionados 100 μL de TE (Tris-HCl 0,1mM, EDTA 0,1mM) para diluição dos ácidos nucleicos. O DNA foi quantificado em Espectrofotômetro NanoDrop ND-100 e gel de agarose a 0,8%. Nas amostras foram observadas concentrações diversas, variando de 180 ng/ μL a 3000 ng/ μL , e ótima qualidade, com as relações A260/280 de aproximadamente 1,8. Após a quantificação, o DNA foi diluído para a concentração de trabalho de 10ng/ μL .

Para as análises moleculares foram feitas reações em cadeia de polimerase (PCR), utilizando marcadores moleculares de microssatélites (SSR) em um termociclador marca Labnet Modelo TC9600-G, em um meio com volume final de 25 μL , contendo 0,4 μL da solução de DNA genômico (40 ng/ μL), 1 μL de cada *primer* (10 μM de *primer* forward, 10 μM de *primer* reverse), juntamente com um mix composto de: 17,6 μL de água estéril; 2,5 μL de tampão 10X (INVITROGEN Life Technologies); 1,5 μL de MgCl_2 25mM (INVITROGEN Life Technologies); 0,75 μL de DNTPs 10mM (INVITROGEN Life Technologies); 0,25 μL de Taq DNA Polimerase 5U/ μL (INVITROGEN Life Technologies). Em seguida procedeu-se a amplificação e a corrida eletroforética a 150 V por uma horas

em gel de poliacrilamida e a visualização após a revelação.

O programa de amplificação consistiu de 94°C de temperatura inicial por cinco minutos, seguidos por 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, temperaturas de anelamento variáveis para cada *primer* (entre 43°C e 59°C) durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto e finalmente 72°C por 7 minutos. As amostras foram então resfriadas a 4°C e posteriormente, os produtos da amplificação do DNA foram armazenados em freezer.

Foram testados 50 pares de *primers* específicos para a espécie, descritos como polimórficos para a cultura do grão-de-bico (Castro *et al.*, 2011; Getahun, *et al.*, 2021; Sefera *et al.*, 2011).

Em cada microtubo contendo 25 µl de DNA amplificado, foram adicionados 5µl de corante DYE para DNA, composto por Tris 1,0 M; pH 8,0; glicerol 100%; EDTA 0,5 M pH 8,0; SDS a 10% e azul de bromofenol. Desta mistura, 10 µl foram aplicados nas canaletas do gel de poliacrilamida 10% submetidos à eletroforese em tampão TBE 1X a 120 volts por duas horas utilizando uma fonte de eletroforese marca PWSys modelo PW300. Esses géis foram constituídos de 10% de acrilamida:bis-acrilamida 30:1, TBE 1X, 0,1% de persulfato de amônio e 0,06% de TEMED. Para efeito de comparação do tamanho dos fragmentos, foi utilizado como padrão o 100 pb DNA Ladder (INVITROGEN *Life Technologies*).

Para a revelação utilizou-se o método de coloração com nitrato de prata. Após a eletroforese, as placas foram separadas e os géis foram imersos em solução fixadora (10% de etanol e 0,5% ácido acético 0,5%) e mantido sob lenta agitação por 20 minutos. Em seguida, o gel foi imerso em um litro de solução de nitrato de prata (AgNO₃) na concentração de 0,2%, sob agitação lenta por 20 minutos. O gel, então, foi lavado com água corrente e mantido sob agitação lenta em solução de revelação (NaOH 3%, formaldeído 0,5%) até a obtenção de bandas, e visualizado em transiluminador.

Após a caracterização molecular e posterior avaliação foram selecionados aqueles *primers* que apresentaram polimorfismo entre as cultivares avaliadas.

3.4 Avaliação do Polimorfismo

Os produtos da amplificação, visualizados no gel, produzidos por cada *primer*, pelas isoenzimas, proteínas de armazenamento e resistentes ao calor, foram utilizados para a elaboração de uma matriz de similaridade genética, por meio do registro da presença (1) e

da ausência (0) de bandas para cada cultivar. A estimativa da similaridade genética (S_{gij}) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908), pela seguinte expressão:

$$\text{Coeficiente de Jaccard: } S_{gij} = \frac{a}{a + b + c}, \text{ sendo:}$$

a = presença de banda em ambos os genótipos i e j ;

b = presença de banda no indivíduo i e ausência no indivíduo j ;

c = ausência de banda no indivíduo i e presença no indivíduo j .

Com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, os genótipos foram agrupados pelo método de UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method*), utilizando-se o programa NTSYS versão 2.11.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.1 Caracterização das cultivares por meio de marcadores morfológicos

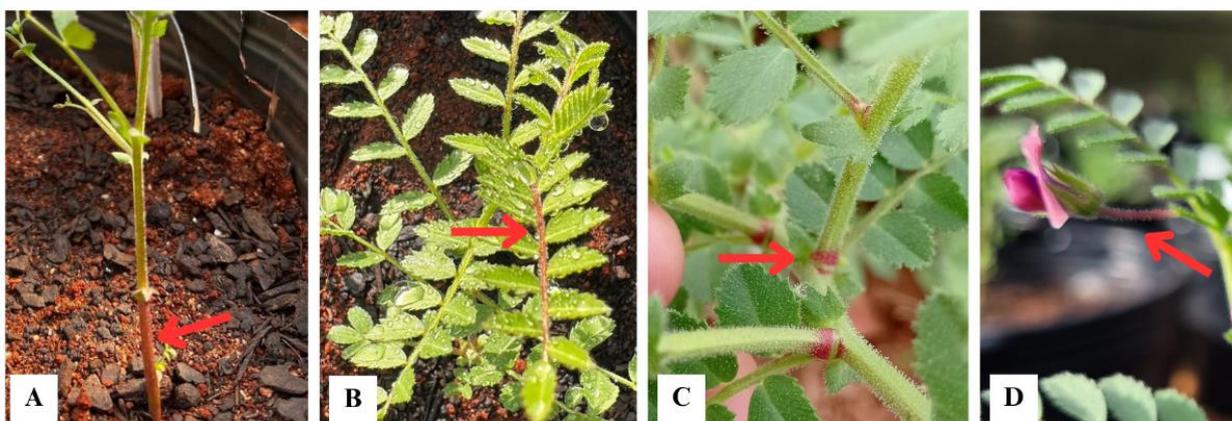
Por meio dos resultados obtidos na caracterização das cultivares em casa de vegetação (Tabela 4), observou-se para as cultivares BRS Kalifa, BRS Cícero, BRS Toro, BRS Aleppo, BRS Cristalino, 10108 e 10209, hábito de crescimento ereto. Para as cultivares BRS Hari, UPL 05 e UPL 06 foram classificadas como de hábito de crescimento ereto a semi-ereto. A ramificação de plantas também variou entre as cultivares e para esta característica, observaram-se plantas com forte ramificação (BRS Kalifa e BRS Cristalino), média ramificação (BRS Aleppo, BRS Hari,) média a fraca (BRS Toro) e fraca ramificação (BRS Cícero 10108, 10209, UPL 05 e UPL 06).

Com relação à presença de antocianina no caule, foi possível observar a presença desta em todas as cultivares que pertencem ao grupo “desi”. No estágio vegetativo, a presença de antocianina foi observada somente no caule, no nível do solo e em pecíolos. No estágio reprodutivo, observou-se a presença deste pigmento em pecíolos, hastes e pedicelos podem apresentar pigmentação arroxeadada (Figura 3).

As antocianinas são compostos flavonóides responsáveis por conferir pigmentação

para uma gama de órgãos vegetais como frutos, flores, caules e folhas. A distribuição da coloração arroxeadada nos órgãos vegetais pode variar tanto entre, quanto dentro de uma mesma espécie, possuindo variações qualitativas na presença e distribuição, e quantitativas na intensidade da cor roxa entre genótipos. (Chaim *et al.*, 2003).

Figura 3 – Pigmentação por antocianina em cultivares de grão-de-bico do grupo desi.



A) Pigmentação por antocianina no caule; B) pecíolo, C) base de hastes; D) pedicelo.

Fonte: Do autor (2024).

A produção destes pigmentos é considerada uma característica de herança complexa e a sua expressão é controlada por vários genes e pode ser afetada por fatores ambientais (Bonow *et al.*, 2007).

Em trabalhos realizados com cultivares de grãos-de-bico do gênero *Cicer*, foi possível verificar que os genes para a pigmentação da antocianina na corola, por exemplo, têm efeitos pleiotrópicos na pigmentação da antocianina em outras partes da planta, com evidências de que múltiplos alelos podem estar envolvidos neste processo de expressão antocianínica (Singh *et al.*, 2006).

Tabela 4 - Caracterização de cultivares de Grão-de-bico com base em descritores da UPOV

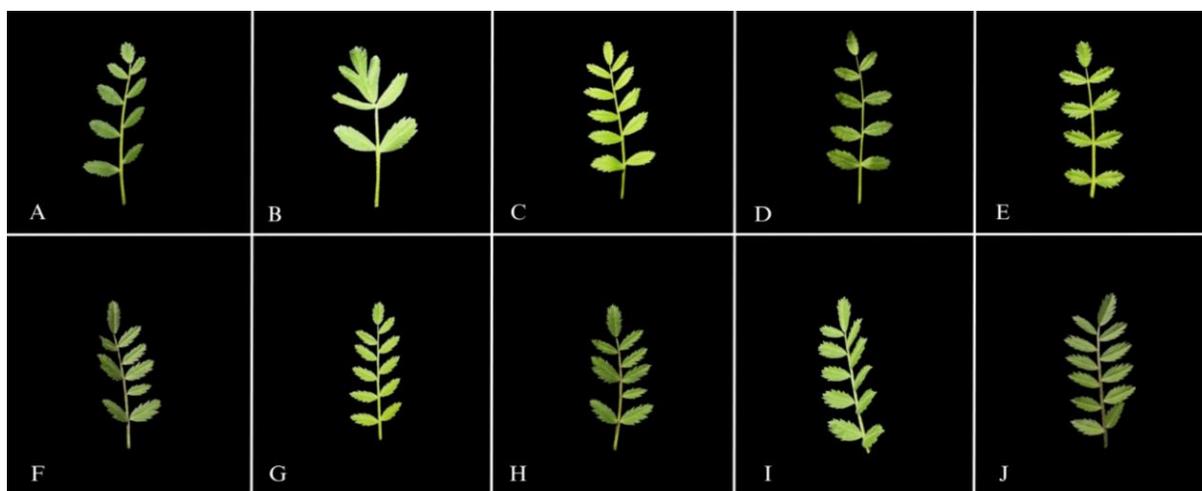
	BRS Kalifa	BRS Cícero	BRS Toro	BRS Aleppo	BRS Cristalino	10108	BRS Hari	10209	UPL 05	UPL 06
Hábito de crescimento	Ereto	Ereto	Ereto	Ereto	Ereto	Ereto	Ereto a semi-ereto	Ereto	Ereto a semi-ereto	Ereto a semi-ereto
Ramificação	Forte	Fraca	Fraca a média	Média	Forte	Fraca	Média	Fraca	Fraca	Fraca
Coloração por antocianina no caule	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Tamanho do folíolo	Pequeno a médio	Grande	Pequeno a médio	Pequeno a médio	Pequeno a médio	Pequeno a médio	Pequeno a médio	Pequeno a médio	Pequeno a médio	Pequeno a médio
Intensidade da cor verde das folhas	Média	Clara a média	Clara a média	Clara a média	Clara a média	Clara a média	Clara a média	Clara a média	Média	Média
Tipo de folha	Pinada	Pinada	Pinada	Pinada	Pinada	Pinada	Pinada	Pinada	Pinada	Pinada
Tempo para florescimento	Precoce	Precoce	Intermediário	Intermediário	Tardio	Intermediário	Intermediário	Intermediário	Precoce	Intermediário
Cor da flor	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Rosa púrpura	Rosa púrpura	Rosa púrpura	Rosa púrpura	Rosa púrpura
Tamanho da vagem	Médio	Grande	Grande	Médio a grande	Médio a grande	Pequeno a médio	Pequeno	Muito pequeno a pequeno	Pequeno	Pequeno
Intensidade da cor verde das vagens	Média	Clara a média	Média	Média	Média	Clara a média	Média	Clara a média	Clara a média	Clara a média
Cor da semente	Marrom acinzentado	Marrom avermelhado	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom				
Intensidade da cor da semente	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara	Média	Escura	Escura	Escura	Escura
Forma das sementes	Redonda para angular	Redonda	Redonda	Angular	Angular	Angular				
Nervuras das sementes	Fraca	Média	Forte	Forte	Fraca	Média	Ausente ou muito fraco	Muito forte	Forte	Forte
Peso de sementes	Alto	Muito alto	Médio	Médio	Médio	Muito baixo	Médio	Médio	Baixo	Médio
Tempo para maturação	Tardio	Precoce	Intermediário	Precoce	Precoce	Intermediário	Precoce	Intermediário	Precoce	Precoce

Fonte: Do autor (2024).

A presença de antocianina é considerada uma importante característica morfológica, amplamente utilizada na identificação de cultivares. Há relatos de uso dessa característica para diversas culturas como milho (Von Pinho *et al.*, 1997), Coentro (Melo *et al.*, 2009), gladiolo (Ferreira *et al.*, 2011); manjerição (Carović-Stanko, *et al.*, 2011), morango (El-Denary *et al.*, 2016), lentilha (Mishra *et al.*, 2022) pimenta (Sujun *et al.*, 2023) e foi considerado um marcador de ótima eficiência para separar genótipos dos dois principais grupos comerciais de feijões existentes no Brasil, carioca e preto (Santos, 2020).

Com relação às características relacionadas às folhas, por meio de análise visual do tamanho do folíolo foi possível distinguir ‘BRS Cícero’ das demais. A cultivar possui folíolos maiores e diferenças morfológicas marcantes nos ápices das folhas (Figura 4). Estas diferenças foram relatadas por Puntel *et al.*, (2023) que, ao utilizarem modelos matemáticos para estimar a área foliar de cultivares de grão-de-bico, verificaram que o mesmo modelo matemático utilizado para as cultivares ‘BRS Aleppo’, ‘BRS Kalifa’, ‘Jamu’ e ‘BRS Toro’, não pode ser aplicado para a cultivar ‘BRS Cícero’, devido às características foliares específicas desta cultivar. Não houve diferença entre as cultivares para a característica tipo de folha. Todas as cultivares utilizadas neste trabalho possuem folhas pinadas. Para a intensidade da cor verde das folhas, foi possível obter classificações de clara a média, e média intensidade.

Figura 4 – Morfologia de folhas de cultivares de grão-de-bico.



A) BRS Kalifa; B) BRS Cícero; C) BRS Toro; D) BRS Aleppo; E) BRS Cristalino; F) 10108; G) BRS Hari; H) 10209; I) UPL 05; J) UPL 06.

Fonte: Do autor (2024).

A intensidade da cor das folhas das plantas é uma característica bastante utilizada na identificação de cultivares, todavia, deve-se ressaltar que uma gama de fatores ambientais, como exposição à luz, características do solo e concentração de nutrientes, principalmente do nitrogênio, afetam, sobremaneira, o padrão de coloração e a intensidade da cor de folhas dos indivíduos. (Millett *et al.*, 2018; Tsutsumida *et al.*, 2022). Além disso, deve-se considerar que mesmo folhas de uma mesma cultivar e estágio fenológico podem exibir variações de cor em diferentes locais, devido à variabilidade espacial de fatores ambientais (Millett *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2021).

Sabe-se que a correlação entre a cor verde das plantas, o teor de clorofila e a razão de clorofila a/b, é bastante significativa. Desta maneira, essas características podem ser alvo de investigações em pesquisas futuras, podendo fornecer subsídios adicionais para as avaliações visuais.

Para as características, tempo para florescimento e tempo para maturação, as cultivares puderam ser classificadas em precoces, intermediárias e tardias. ‘BRS Kalifa’ foi mais precoce em relação ao florescimento (42 dias após a semeadura). Entretanto, foi a mais tardia em relação à maturação, alcançada aos 142 dias após a semeadura. A segunda mais precoce foi ‘BRS Cícero’ que atingiu o florescimento aos 45 dias após a semeadura. Esta cultivar também foi a mais precoce para a maturação atingindo-a aos 115 dias após a semeadura. ‘BRS Cristalino’ é mais tardia para o florescimento, com cerca de 72 dias após a semeadura.

Ressalta-se que os tempos para florescimento e maturação são fatores chave para identificar e determinar a adaptação de cultivares a diversos ambientes, sendo a temperatura e o fotoperíodo as principais variáveis ambientais que afetam o ritmo de desenvolvimento destes processos (Tsubokura *et al.*, 2013; Yin, 2008;).

O efeito da temperatura e do fotoperíodo no tempo de florescimento de plantas de grão-de-bico são variáveis. Daba *et al.* (2016) relatam que os genes que controlam o período de floração do grão-de-bico são sensíveis à temperatura e às mudanças de latitude. Estes autores verificaram que plantas de grão-de-bico floresceram mais cedo em dias longos e temperaturas mais elevadas do que em dias curtos e temperaturas mais baixas. Plantas adaptadas às latitudes mais baixas floresceram mais cedo, aqueles adaptados aos diversos ambientes floresceram intermediariamente e os acessos adaptados às latitudes mais altas floresceram mais tarde.

A cor da flor é considerada um dos principais marcadores morfológicos, principalmente por possuir alta confiabilidade e ser de fácil detecção. No presente trabalho, foi possível distinguir com clareza todas as cultivares que pertencem ao grupo kabuli e ao grupo desi por meio desta característica. Para o grão-de-bico, esta característica é monogênica (Atanasova; Mihov, 2006; Hasan; Deb, 2013; Namrata *et al.*, 2017). Desta forma, é importante destacar que a presença de características com controle genético monogênico e dominância completa é fundamental na caracterização de cultivares, uma vez que, em sua maioria, essas características não são substancialmente influenciadas pelo ambiente a ponto de alterar sua expressão fenotípica (Andrade, 2012).

Em estudos de herança da cor das flores do grão-de-bico observam-se que as cores rosa das flores são dominantes sobre a cor branca. Namrata *et al.* (2017), constataram que a geração F₁ de cruzamentos entre plantas com flores rosa e brancas produzem apenas flores rosa, revelando que a cor rosa é dominante sobre cor branca das flores no grão-de-bico. Na geração F₂, os autores observaram que a segregação para a característica cor das flores em rosa e branca seguindo proporção mendeliana de 3:1. Sendo assim, este resultado comprova a natureza monogênica da herança para a cor da flor e sugere que o branco da flor do grão-de-bico é governada por um único gene recessivo. Essas características por sua vez, podem ser utilizadas como marcadores genético em melhoramento da cultura para reconhecimento precoce do caráter híbrido das plantas (Atanasova *et al.*, 2006; Rathod *et al.*, 2021). Assim, também é um importante marcador para certificação da pureza genética em lotes de sementes e para a identificação de cultivares como descritor estável para o registro nacional de cultivares.

Para a característica tamanho de vagem, as cultivares receberam as classificações de muito pequeno a pequeno (10209), pequeno (BRS Hari, UPL 05 e UPL 06), pequeno a médio (10108), médio (BRS Kalifa), médio a grande (BRS Aleppo e BRS Cristalino, e grande (BRS Cícero e BRS Toro). Com relação à intensidade da cor verde das vagens a variação foi semelhante à intensidade da cor verde das folhas, apresentando as classificações de intensidade clara a média, e média.

Para a cultura do grão-de-bico, as características relacionadas às sementes são distintas nos níveis varietais e de agrupamentos (Gediya *et al.*, 2018). Na avaliação do peso de 100 sementes, as cultivares foram classificadas em grupos de sementes de peso muito baixo (< 20g), sendo registrado para a cultivar '10209', sementes de peso baixo (20-25g) na cultivar '10108'; de peso médio (26-35g) nas cultivares 'UPL 05', 'UPL 06', 'BRS

Hari', 'BRS Aleppo', 'BRS Toro' e 'BRS Cristalino'; alto (36-45g) para a cultivar 'BRS Kalifa' e muito alto (> 45g) registrado para a cultivar 'BRS Cícero'. O peso de sementes é uma característica complexa pelo fato de envolverem maior número de genes. Em geral, caracteres quantitativos são mais sensíveis as variações ambientais do que caracteres qualitativos.

Quanto à intensidade e cor da semente, conforme classificações disponíveis nos descritores da UPOV, as cinco cultivares do grupo kabuli foram classificadas como marrom acinzentado e de intensidade clara da cor. As sementes das cultivares do grupo desi receberam as classificações de marrom avermelhado e marrom, possuindo intensidade de cor média a escura. Com relação à forma da semente, observa-se no grupo kabuli a forma é redonda para angular e do grupo desi são redondas ou angulares. Quanto às nervuras das sementes, verificou-se variação diversa dentro dos dois grandes grupos. As cultivares do grupo kabuli, 'BRS Kalifa' e 'BRS Cristalino' receberam classificação fraca, 'BRS Cícero' média e 'BRS Toro' e 'BRS Aleppo' forte. Quanto às nervuras em sementes do grupo desi, a cultivar 'BRS Hari' foi classificada em ausente ou muito fraca; 10108 com média nervação, 'UPL 05' e 'UPL 06' forte e '10209' muito forte.

As características morfológicas têm sido um componente importante no contexto da identificação de cultivares e certificação da pureza genética. Não é possível identificar variedades utilizando um único parâmetro. Descrições morfológicas detalhadas das plantas e sementes, associadas com outras metodologias de fenotipagem são ferramentas essenciais (Gediya *et al.*, 2018).

4.2 Análise de imagem em sementes

Nas Tabelas 5, 6 e 7 encontram-se os resultados referentes à geometria e às características de cores e dominância, identificadas pelo sistema GroundEye®, para as dez cultivares de grão-de-bico (Figura 5).

As dominâncias de cores laranja e vermelho foram observadas com maior predominância e intensidade nas sementes de grão-de-bico. Em sementes do grupo kabuli, que incluem 'BRS Kalifa', 'BRS Cícero', 'BRS Toro', 'BRS Aleppo' e 'BRS Cristalino', houve maior predominância da cor laranja.

Figura 5 – Sementes de cultivares de grão-de-bico avaliadas por meio de análise de imagens em equipamento GroundEye®, versão S120.



A) BRS Kalifa; B) BRS Cícero; C) BRS Toro; D) BRS Aleppo; E) BRS Cristalino; F) 10108; G) BRS Hari; H) 10209; I) UPL 05; J) UPL 06.

Fonte: Do autor (2024).

Tabela 5 - Valores médios, em porcentagem (%), da dominância de cores: azul, celestial, cinza-claro, cinza-escuro, laranja, púrpura, rosa e vermelho de sementes de cultivares de grão-de-bico, obtidos no equipamento GroundEye®.

Cultivares	Dominâncias (%)							
	Azul	Celestial	Cinza claro	Cinza escuro	Laranja	Púrpura	Rosa	Vermelho
BRS Kalifa	0,12 E	0,80 C	0,08 A	5,13 D	82,11 A	0,02 D	0,56 F	11,14 F
BRS Cícero	0,14 E	0,98 B	0,04 B	4,47 E	82,17 A	0,03 D	0,53 F	11,92 F
BRS Toro	0,22 D	1,15 A	0,03 B	6,64 B	81,90 A	0,02 D	0,30 G	9,69 G
BRS Aleppo	0,28 D	0,97 B	0,11 A	6,92 B	70,55 B	0,05 D	0,78 E	20,28 E
BRS Cristalino	0,17 E	0,98 B	0,07 A	5,98 C	82,94 A	0,02 D	0,35 G	9,45 G
10108	1,52 A	0,76 C	0,00 C	8,45 A	11,17 D	0,71 A	3,44 A	73,43 B
BRS Hari	1,39 B	0,54 F	0,00 C	5,26 D	12,52 D	0,63 B	2,29 B	77,28 A
10209	1,44 B	0,80 C	0,00 C	6,24 C	25,42 C	0,65 B	2,06 C	63,12 D
UPL 05	1,26 C	0,69 D	0,00 C	4,85 E	25,35 C	0,48 C	1,31 D	65,84 C
UPL 06	1,42 B	0,61 E	0,00 C	5,94 C	13,81 D	0,51 C	2,19 B	75,41 A
CV (%)	6,08	5,39	72,56	6,36	2,77	11,44	7,28	3,13

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott no nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2024).

Nas sementes das demais cultivares, que pertencem ao grupo desi, predominou a coloração vermelha. Visualmente, tons de laranja podem ser percebidos como mais claros do que tons de vermelho, coincidindo, portanto com a identificação realizada por meio do equipamento GroundEye®. As sementes do grupo kabuli possuem tonalidades mais claras

em detrimento do grupo desi, que são conhecidas pela tonalidade escura de seu tegumento.

De maneira geral, é possível distinguir as cultivares quanto à coloração. As dominâncias de cores azul, celestial, cinza-claro, cinza-escuro, rosa e púrpura também foram detectadas de modo representativo nas amostras, que permitem também a diferenciação de cultivares.

Tabela 6 - Valores médios, em porcentagem (%), de características de cor: brilho, intensidade, luminosidade, matiz, saturação e textura de sementes de cultivares de grão-de-bico, obtidos no equipamento GroundEye®.

Cultivares	Características da cor (%)					
	Brilho	Intensidade	Luminosidade	Matiz	Saturação	Textura
BRS Kalifa	0,63 A	0,51 A	0,52 A	35,76 F	0,33 B	130,73 A
BRS Cícero	0,63 A	0,51 A	0,52 A	34,03 F	0,33 B	129,45 A
BRS Toro	0,59 C	0,49 C	0,50 C	37,59 F	0,32 C	124,03 C
BRS Aleppo	0,61 B	0,50 B	0,51 B	40,24 E	0,31 D	127,33 B
BRS Cristalino	0,61 B	0,49 C	0,50 C	36,64 F	0,33 B	126,17 B
10108	0,38 G	0,30 E	0,32 E	100,09 A	0,32 C	74,99 F
BRS Hari	0,40 D	0,32 D	0,33 D	59,24 C	0,34 A	79,04 D
10209	0,39 E	0,31 D	0,33 D	63,78 B	0,33 B	78,07 E
UPL 05	0,38 F	0,30 F	0,31 F	44,44 D	0,34 A	74,07 F
UPL 06	0,39 E	0,31 D	0,33 D	64,82 B	0,32 C	77,25 E
CV (%)	0,91	1,19	1,11	4,82	1,64	0,9

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott no nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2024).

Com base nas características de cor: brilho, intensidade, luminosidade, matiz, saturação e textura também foi possível diferenciar as cultivares. Esses fatores de diferenciação de cores referem-se à vivacidade ou palidez de uma cor e estão associados à sua pureza (Melo *et al.*, 2022).

Em sementes do grupo Kabuli foram observados os maiores percentuais para as características brilho, intensidade, luminosidade e textura, com destaque para as cultivares BRS Kalifa e BRS Cícero. Para as características matiz e saturação, observaram-se as maiores médias em sementes do grupo desi.

A geometria da semente é uma outra característica de extrema relevância, especialmente quando da seleção de materiais para o melhoramento genético e tem sido amplamente empregada como marcador distintivo entre gêneros, espécies e diferentes cultivares (Marcos Filho, 2015).

Tabela 7- Valores médios da área (cm²), circularidade, diâmetro máximo (cm) e diâmetro mínimo (cm) e perímetro (cm), de sementes de cultivares de grão-de-bico, obtidos no equipamento GroundEye®.

Cultivares	Geometria				
	Área (cm ²)	Circularidade	Diâmetro máximo	Diâmetro mínimo	Perímetro (cm)
BRS Kalifa	0,59 B	0,86 A	0,93 B	0,79 B	2,93 B
BRS Cícero	0,72 A	0,85 B	1,04 A	0,87 A	3,27 A
BRS Toro	0,57 C	0,82 D	0,94 B	0,76 C	2,91 B
BRS Aleppo	0,53 D	0,84 B	0,89 C	0,74 D	2,80 C
BRS Cristalino	0,58 B	0,86 A	0,93 B	0,79 B	2,92 B
10108	0,42 G	0,83 C	0,80 F	0,67 G	2,47 F
BRS Hari	0,46 F	0,84 B	0,83 E	0,71 E	2,59 E
10209	0,35 H	0,73 F	0,79 F	0,57 H	2,36 G
UPL 05	0,48 E	0,78 E	0,88 C	0,69 F	2,67 D
UPL 06	0,48 E	0,82 D	0,86 D	0,71 E	2,69 D
CV (%)	1,94	0,95	1,15	1,04	0,97

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott no nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2024).

A partir dos resultados de geometria gerados pela análise de imagens no equipamento GroundEye®, verificou-se que por meio da área, circularidade dos diâmetros máximo e mínimo, e do perímetro, foi possível diferenciar as cultivares. Conforme esperado, observou-se que em sementes das cultivares do grupo kabuli as maiores médias para a maioria as características analisadas. Apesar disso, ressalta-se que existe uma grande variação no tamanho das sementes dentro e entre os tipos de grão-de-bico, com sementes de alguns genótipos do tipo desi tão grandes quanto nas do tipo kabuli e alguns tipos kabuli com sementes pequenas como as do tipo desi (Hossain *et al.*, 2010; Kumar; Singh 1995).

Sabe-se que o tamanho de sementes é uma característica extremamente relevante quando da comercialização. Em leguminosas, o tamanho e o peso das sementes é o que determina a produtividade. Desta maneira, representa um importante marcador para a seleção e diferenciação de materiais, visto que, as características físicas gerais de uma semente são um fator chave de marketing e podem afetar o preço e a aceitabilidade do consumidor (Hossain *et al.* 2010; Rajkumar *et al.*, 2021).

Por se tratar de um marcador importante para a cultura, destaca-se que os estudos de herança do tamanho de sementes de grão-de-bico e genes associados são importantes para entender a relação do controle genético para esta característica. Rajkumar *et al.* (2021)

validaram cerca de 80 SNPs, selecionados aleatoriamente, e verificaram associação destes para 30 genes relacionados ao tamanho/peso de sementes de grão-de-bico. Em pesquisas tem sido observado que a herança já foi relatada como monogênica (Sundaram *et al.*, 2019), digênica (Upadhyaya *et al.*, 2006) e poligênica (Sharma *et al.*, 2013; Kivrak *et al.*, 2020). Uma das principais razões desta diferença decorre da preferência fenotípica referente às cultivares utilizadas pelos pesquisadores (Kivrak *et al.*, 2020). Upadhyaya *et al.* (2006) observaram em suas pesquisas que o tamanho pequeno de sementes de grão-de-bico é considerado dominante sobre o tamanho grande, sendo esta característica governada por dois genes que possuem epistasia de dominância. Como característica poligênica, relatada por Kivrak *et al.* (2020), o tamanho de sementes foi governado por genes aditivos e dominantes.

Sundaram *et al.* (2019) destacam em suas pesquisas que o ambiente tem uma influência relativamente baixa no tamanho das sementes, atribuindo a variação natural do tamanho das sementes ao número e tamanho das células dos cotilédones, que é bastante comum em leguminosas.

4.3 Validação da Pureza Genética

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados médios dos percentuais de acerto e erro dos avaliadores, obtidos durante a certificação da pureza genética das cultivares de grão-de-bico. Na avaliação realizada no estádio vegetativo, verificou-se que em seis cultivares houve porcentagem de acerto $\geq 50\%$. A maior porcentagem de acerto foi de 96,1% para a cultivar BRS Cícero. A principal característica observada pelos avaliadores que propiciou diferenciá-la das demais foi o tamanho e a morfologia de suas folhas. A menor porcentagem de acerto ocorreu para a cultivar 10209, 29,8%. A baixa porcentagem de acerto para esta cultivar pode ser atribuída pelo fato de que nesta fase, não foi observada nenhuma característica que permitisse a separação desta das demais plantas contaminantes.

Além disso, ressalta-se que a heterogeneidade no vigor de plantas e a ausência de antocianina no caule, que era esperada no início do ciclo desta cultivar, podem ter contribuído para o baixo percentual de acertos. De maneira geral, os descritores recomendados pela UPOV para a cultura do grão-de-bico foram utilizados como base em todas as fases de avaliação. No estádio vegetativo, as características utilizadas para a

identificação das plantas foram hábito de crescimento, ramificação, coloração por antocianina, tipo de folha, tamanho do folíolo e intensidade da cor verde das folhas.

Tabela 8. Resultados de identificação (% de acerto e % de erro) de plantas de diferentes cultivares de grão-de-bico, em três épocas de avaliação.

Cultivar	Épocas de avaliação			
		Estádio vegetativo	Florescimento	Pré-colheita
BRS Kalifa	% acertos	52,7 ± 20,2*	56,9 ± 20,2	38,8 ± 17,2
	% erros	29,1 ± 4,66	22,4 ± 7,0	38,5 ± 4,3
BRS Cícero	% acertos	96,1 ± 6,8	98,6 ± 2,3	52,6 ± 11,2
	% erros	3,6 ± 3,7	1,6 ± 1,7	26,0 ± 6,2
BRS Toro	% acertos	68,3 ± 7,3	46,4 ± 11,8	37,5 ± 7,8
	% erros	31,2 ± 9,0	36,4 ± 3,5	35,4 ± 12,6
BRS Aleppo	% acertos	63,3 ± 7,5	52,0 ± 9,1	43,7 ± 3,6
	% erros	22,3 ± 5,8	23,4 ± 6,8	30,7 ± 7,0
BRS	% acertos	38,8 ± 7,4	50 ± 9,4	36,2 ± 11,9
Cristalino	% erros	34,4 ± 3,5	28,6 ± 3,1	38,0 ± 2,7
10108	% acertos	46 ± 11,5	43,4 ± 6,9	45,6 ± 13,9
	% erros	39,5 ± 3,3	35,9 ± 3,4	39,5 ± 2,9
BRS Hari	% acertos	41,7 ± 8,5	65,7 ± 16,9	46,0 ± 15,5
	% erros	36,9 ± 6,3	28,1 ± 3,5	39,5 ± 8,7
10209	% acertos	29,8 ± 9,7	48,8 ± 6,2	61,9 ± 17,5
	% erros	51,5 ± 8,8	38,0 ± 6,5	31,8 ± 5,2
UPL 05	% acertos	50 ± 13,2	72,2 ± 12,4	63,8 ± 12,1
	% erros	43,2 ± 5,4	24,4 ± 7,4	24,5 ± 7,3
UPL 06	% acertos	61,1 ± 21,9	73,5 ± 12,8	63,2 ± 20,5
	% erros	30,7 ± 12,1	19,2 ± 6,1	26,5 ± 7,0

* - Desvio padrão da média

Fonte: Do autor (2024).

No florescimento, o maior percentual de acerto, 98,6% e o menor percentual de erro, 1,6%, foram observados para a cultivar BRS Cícero. Além das características das folhas, a cor da flor foi indicada pelos avaliadores como fator determinante para diferenciar esta cultivar das demais, sendo observado maior valor de acertos em relação à fase vegetativa. Para a cultivar BRS Toro foi observado 46,4% de acerto, o menor percentual em relação ao

observado para as demais cultivares. A razão pela redução do percentual de acerto, para esta cultivar em relação à fase vegetativa, se dá pela similaridade morfológica, neste estágio fenológico, além do dessincronismo no florescimento, em relação às demais.

No florescimento, avaliação realizada aos 100 dias após a semeadura, para sete cultivares houve percentagem de acerto \geq a 50%. A maioria das cultivares foi diferenciada, com maior percentagem de acerto, do que na avaliação anterior. Isto se deve ao fato de que nesta fase, o número de descritores a serem avaliados foi maior que na fase vegetativa, aos 40 dias.

Na pré-colheita, avaliação realizada aos 140 dias após a semeadura, observou-se redução significativa da percentagem de acertos para todas as cultivares do grupo kabuli. Em todas as cultivares deste grupo, com exceção da BRS Cícero, a percentagem de acertos foi inferior a 50%. Já para as cultivares do grupo desi foi observado aumento no percentual de acertos, em relação ao florescimento, apenas em '10108' e '10209'. O baixo percentual de acertos nesta fase se deve, principalmente, pela diferença entre os ciclos das cultivares.

Devido às diferenças no ciclo das cultivares, parte das plantas de algumas cultivares apresentava senescência completa, isto é, com folhas, hastes e vagens completamente secos. De acordo com os avaliadores, esta foi a principal dificuldade de avaliação nesta fase, visto que houve redução dos caracteres a serem observados e as plantas no final do ciclo apresentavam similaridade considerável. O maior percentual de acerto observado para as cultivares do grupo desi pode ser explicado pelo tamanho e quantidade de vagens. Os avaliadores apontaram que as plantas deste grupo se apresentavam com alta densidade de vagens pequenas por planta.

É importante ressaltar que para o registro nacional de cultivares, segundo o decreto nº 10.586 e Portaria nº 502 de 19 de outubro de 2022 há a necessidade de caracterizar as cultivares por meio de descritores os quais podem ser morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares. Estes descritores deverão apresentar homogeneidade e estabilidade, além de permitir a diferenciação entre as cultivares neste contexto, com base nos resultados observados nesta pesquisa, para a distinção de cultivares, é preciso utilizar várias características morfológicas sejam em sementes, em plantas nos diferentes estágios fenológicos. De fato não foi possível diferenciar as diferentes cultivares utilizando-se de poucos descritores.

Os descritores utilizados para a identificação de cultivares também serão utilizados em programas de controle de qualidade externo e interno, para a certificação da pureza

genética. Assim, aqueles descritores, mesmo previstos por órgãos oficiais, mas que são subjetivos, não são seguros para a identificação de cultivares e certificação da pureza genética.

A utilização de lotes de sementes com alta pureza genética é fundamental para que as características das cultivares sejam mantidas e expressas nos cultivos subsequentes; e por isso, as etapas de obtenção e multiplicação das sementes devem ser conduzidas com muito rigor (Padilha *et al.*, 2003). Neste viés, as diretrizes que tratam da produção de sementes estão dispostas na portaria MAPA nº 538 de 20 de dezembro de 2022, documento que substitui a IN nº. 9, de 2 de junho de 2005.

A portaria estabelece que vistorias obrigatórias sejam realizadas para identificar, de forma prévia e no momento adequado, possíveis não conformidades. A legislação determina duas vistorias obrigatórias, sendo uma no florescimento e a outra na pré-colheita e, partir destas, os campos podem ser aprovados ou condenados. A não realização de vistoria implica no cancelamento do campo de produção de sementes (Brasil, 2022).

Com base nos resultados obtidos na avaliação de plantas contaminantes, verificou-se que para as cultivares BRS Toro, BRS Aleppo e 10108, o maior percentual de acertos foi obtido exatamente no estágio vegetativo, fase em que a legislação não exige a realização de vistoria obrigatória. A certificação da pureza genética via marcadores morfológicos requer um controle acurado, principalmente devido ao fato de que alguns caracteres sofrem alteração dentro de uma mesma espécie e por serem influenciados pelo ambiente.

As diferenças morfológicas acontecem em diversos grupos de plantas. Um exemplo disto é a pesquisa de Von Pinho *et al.* (1997). Os autores ressaltam que a fase de desenvolvimento das plantas de milho, mais adequada para a avaliação da pureza genética, pode variar com o híbrido e isto acontece porque existe variabilidade em cada população híbrida que depende, sobretudo, da diferença genética entre as linhas parentais. Por isso, o ideal é que vistorias nos campos de produção de sementes sejam realizadas durante todos os estádios fenológicos das culturas, especialmente no início do desenvolvimento da cultura para que eventuais problemas sejam identificados logo no início e que isto não comprometa a futura comercialização (Ferreira *et al.*, 2011).

Por meio dos resultados do teste de qui-quadrado (χ^2) aplicados aos dados de identificação de plantas de cultivares de grão-de-bico em diferentes estádios de desenvolvimento, observou-se que houve significância apenas para as cultivares 'BRS Cristalino' na pré-colheita ($\chi^2 = 8,41$) e 10209 ($\chi^2 = 10,56$) no estágio vegetativo. Para a

avaliação realizada no florescimento, não houve significância dos desvios entre os resultados obtidos pelos quatro avaliadores. Sendo assim, a não significância neste caso pode indicar que os erros foram devido ao acaso (erro amostral) e por isso, podem ser aceitas as variações que ocorreram entre os resultados obtidos pelos avaliadores.

Nas avaliações realizadas para a cultivar BRS Cícero nos estádios vegetativo e reprodutivo/florescimento, foram observados baixíssimos valores de qui-quadrado, e altas taxas de acerto. Isto indica que a separação desta cultivar de seus respectivos contaminantes, por meio de marcadores morfológicos, é possível e altamente recomendável nas fases supracitadas.

Ao comparar os resultados obtidos no teste de qui-quadrado com os resultados das taxas de erro e acertos, observou-se que a significância dos desvios ocorreu exatamente nas fases e cultivares nas quais foram observadas as menores taxas de acertos. Sendo assim, pode-se afirmar que nestes casos específicos de significância, os erros não foram devido ao acaso e, sim, a outras causas como por exemplo a ausência de descritores morfológicos para a diferenciação das cultivares trabalhadas.

Ressalta-se que, apesar da possibilidade de uso dos marcadores morfológicos para diferenciar cultivares, visando também o registro nacional de cultivares, o uso de outros descritores de natureza bioquímica ou molecular podem ser necessários, considerando que algumas cultivares utilizadas são muito similares morfológicamente, fato que contribuiu, de maneira bastante significativa, para as baixas taxas de acerto e elevados valores de qui-quadrado em alguns casos.

Os usos de descritores de outras naturezas têm sido recomendados, inclusive, pela legislação nacional. A portaria MAPA de nº 502, de 19 de outubro de 2022, regimento que trata das normas para o Registro Nacional de Cultivares (RNC), prevê que além de características morfológicas, descritores de ordem fisiológica, bioquímica ou molecular que sejam herdados geneticamente, podem ser utilizados na identificação de cultivares.

De maneira geral, entre os descritores avaliados, a coloração por antocianina no caule, a cor da flor, a cor da semente, intensidade da cor da semente e a forma das sementes; somados às avaliações de características e dominância de cores e à geometria de sementes, foram os descritores morfológicos mais seguros para distinção dos grupos kabuli e desi de grão-de-bico.

4.4 Marcadores moleculares de proteínas

Estão apresentados a seguir, os padrões de proteínas, utilizados para a identificação das 10 cultivares de grão-de-bico. Considerando-se as análises qualitativas, presenças e ausências de bandas. Com o objetivo de facilitar a visualização dos resultados, foram elaborados zimogramas

Na Figura 6, que representa o padrão de subunidades obtido para a enzima álcool desidrogenase (ADH), foi observado baixo polimorfismo, sendo possível separar apenas a cultivar 10209 das demais. Sabe-se que a álcool desidrogenase é uma enzima fermentativa que converte acetaldeído em etanol na ausência de oxigênio (Zhang *et al.*, 2017). São enzimas multifuncionais que desempenham papéis importantes em vários processos fisiológicos incluindo metabolismo de álcool, resposta ao estresse e desenvolvimento vegetal. as ADHs em plantas são compostas por diferentes subunidades (ADH1, ADH2, ADH3, ADH4 e ADH5) que possuem diferentes distribuições teciduais e podem ser expressas em diferentes estádios do desenvolvimento vegetal (Strommer, 2011).

Tesniere e Verries (2001) destacam que a atividade da ADH é geralmente baixa sob tensão normal de oxigênio, mas aumenta fortemente quando a ausência de oxigênio leva à fermentação etanólica, e por isso, ela pode ser detectada mais facilmente em plantas que passaram por alguma condição adversa.

Figura 6 – Zimograma da isoenzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes de cultivares de grão-de-bico.



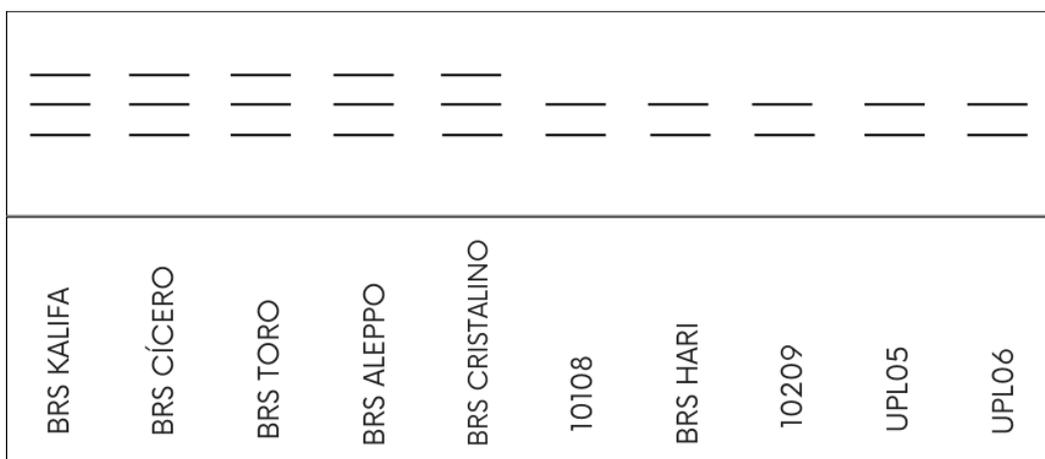
Fonte: Do autor (2024).

Os genes que codificam para a ADH são expressos nos tecidos vegetais em diferentes estádios de desenvolvimento e a sua atividade pode ser induzida, sobremaneira, por diferentes estresses ambientais (Shi *et al.*, 2017), como por exemplo, baixas temperaturas, estresses hídrico e salinos (Zhang *et al.*, 2015). Apesar disso, no contexto da identificação de cultivares e certificação da pureza genética, é considerado um marcador promissor, principalmente, por ser encontrado em diversos tecidos durante o crescimento e desenvolvimento das plantas. Ademais, destaca-se que estes marcadores têm sido recomendados por instituições de pesquisa e organizações que possuem por escopo, administrar os tratados relativos à proteção de variedades de plantas, como a UPOV.

Em várias pesquisas este sistema enzimático foi utilizado para a distinção de cultivares. Menezes *et al.* (2008), verificaram que a enzima ADH foi um eficiente marcador para a distinção de linhagens e híbridos de milho, utilizando-se sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica. Silva *et al.* (2016) obteve êxito no uso deste sistema para a identificação de cultivares de milho e Vieira *et al.* (2009) para cultivares de soja.

Na Figura 7 está representado o zimograma referente à expressão da enzima malato desidrogenase (MDH). Por meio da MDH foi possível separar as cultivares do grupo kabuli em relação ao grupo desi. No primeiro grupo, composto pelas cultivares BRS Kalifa, BRS Cícero, BRS Toro, BRS Aleppo e BRS Cristalino, foi observada uma isoforma, de maior peso molecular. Já para o segundo grupo, composto pelas cultivares 10108, BRS Hari, 10209, UPL 05 e UPL 06, esta isoforma estava ausente.

Figura 7 – Zimograma da isoenzima malato desidrogenase (MDH) em sementes de cultivares de grão-de-bico.



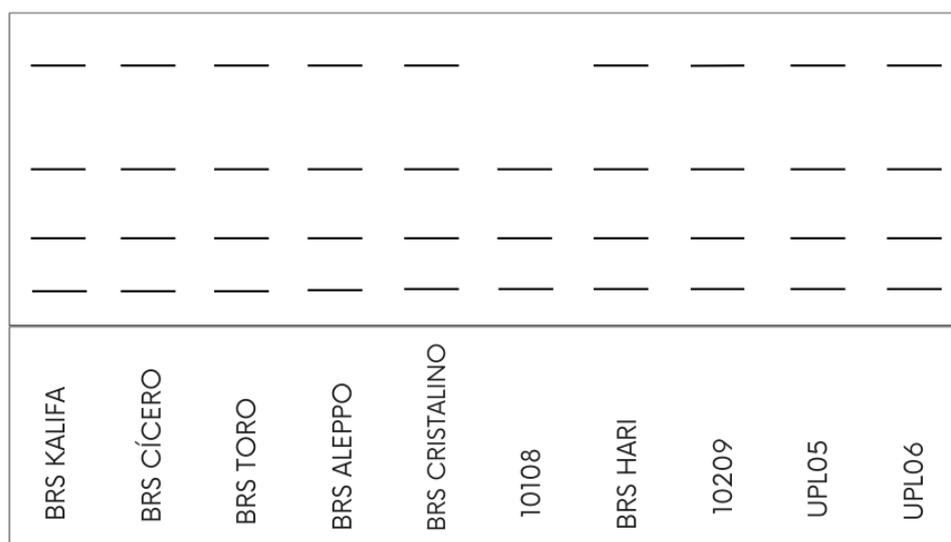
Fonte: Do autor (2024).

Com relação direta à respiração celular, a MDH é a enzima responsável pela transformação de malato a oxaloacetato no final do Ciclo de Krebs (Taiz; Zeiger, 2017). Nas células vegetais, pode ser encontrada nas mitocôndrias, fornece energia às plântulas, nos estádios iniciais de crescimento; e no citoplasma, desempenha o papel de mecanismo de transporte entre componentes subcelulares e participa do metabolismo ácido (Yudina, 2012; Hoptsi *et al.*, 2023).

Yudina (2012) relata que esta isoenzima pode ser considerada um marcador confiável e útil em estudos genéticos, por possuir múltiplas formas moleculares e alta atividade em diversos órgãos e tecidos vegetais. A separação de grupos de cultivares utilizando a ADH também foi relatada em pesquisa de Hoptsi *et al.* (2023). Os autores verificaram que este sistema enzimático exibiu diferentes isoformas para acessos de maturação precoce e maturação tardia em cultivares de amaranto. A ADH também foi importante para a identificação de variedades de banana (Mandal *et al.*, 2001); híbridos de milho (Salgado, 2006), cultivares de gladiolo (Ferreira *et al.*, 2011), genótipos de manga (Majumder *et al.*, 2012), além de cultivares de milho (Silva *et al.*, 2016) e rabanete (Cruz *et al.*, 2014).

Para a catalase (CAT), verificou-se baixo polimorfismo no padrão de bandas para as diferentes cultivares (Figura 8). Foi possível distinguir apenas a cultivar 10108 das demais, por meio da ausência de uma isoforma de maior peso molecular.

Figura 8 – Zimograma da isoenzima catalase (CAT) em sementes de cultivares de grão-de-bico.



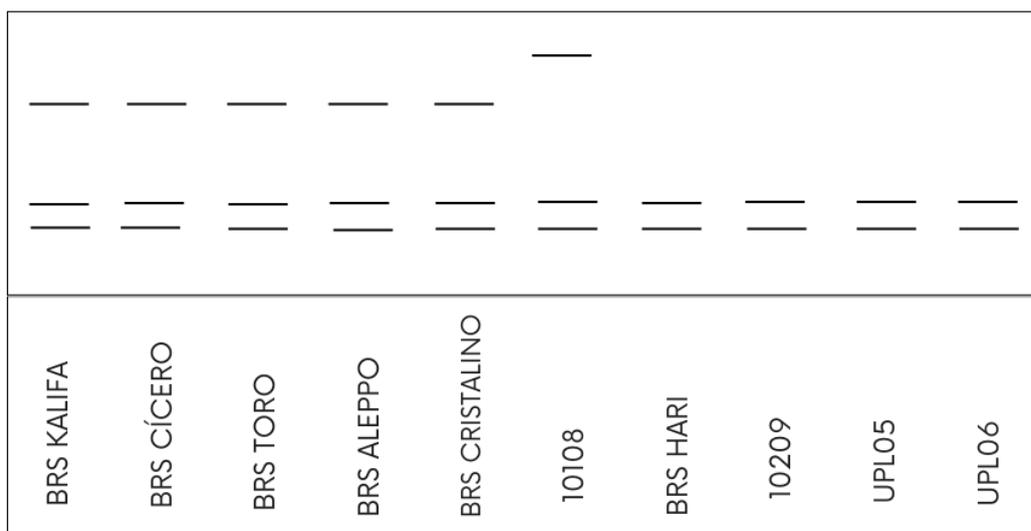
Fonte: Do autor (2024).

As catalases são as enzimas responsáveis por converter o peróxido de hidrogênio em H₂O e O₂, sendo consideradas como um importante canal de limpeza na remoção das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) das células (Taiz; Zeiger, 2017).

A presença de múltiplas isoenzimas de catalase sugere a versatilidade estrutural e funcional deste sistema em uma variedade de espécies de plantas. O seu uso para fins de identificação e caracterização de cultivares é bastante frequente e com resultados diversos. Bonow *et al.* (2007), em diferentes genótipos de arroz, Silva *et al.* (2016), em cultivares de milho e Cruz *et al.* (2014) em rabanete, não conseguiram distinguir cultivares destas espécies por meio deste sistema. Salgado *et al.* (2006) e Kumari *et al.* (2018) observaram perfil eletroforético polimórfico que permitiu diferenciar híbridos de milho de suas linhagens. Para a cultura do grão-de-bico, este sistema isoenzimático é bastante aplicado para a classificação de cultivares em relação às tolerâncias às baixas temperaturas (Kaur *et al.*, 2012), à seca (Raheleh *et al.*, 2012) e para a tolerância à infecção por patógenos (Gayatri Devi *et al.*, 2012).

Por meio do padrão de bandas obtido para a esterase (EST) (Figura 9), foi possível a separação das cultivares em três grupos, o primeiro foi composto pelas cultivares BRS Kalifa, BRS Cícero, BRS Toro, BRS Aleppo e BRS Cristalino, o segundo, apenas pela cultivar 10108; e o terceiro pelas cultivares BRS Hari, 10209, UPL 05 e UPL 06.

Figura 9 – Zimograma da isoenzima esterase (EST) em sementes de cultivares de grão-de-bico.



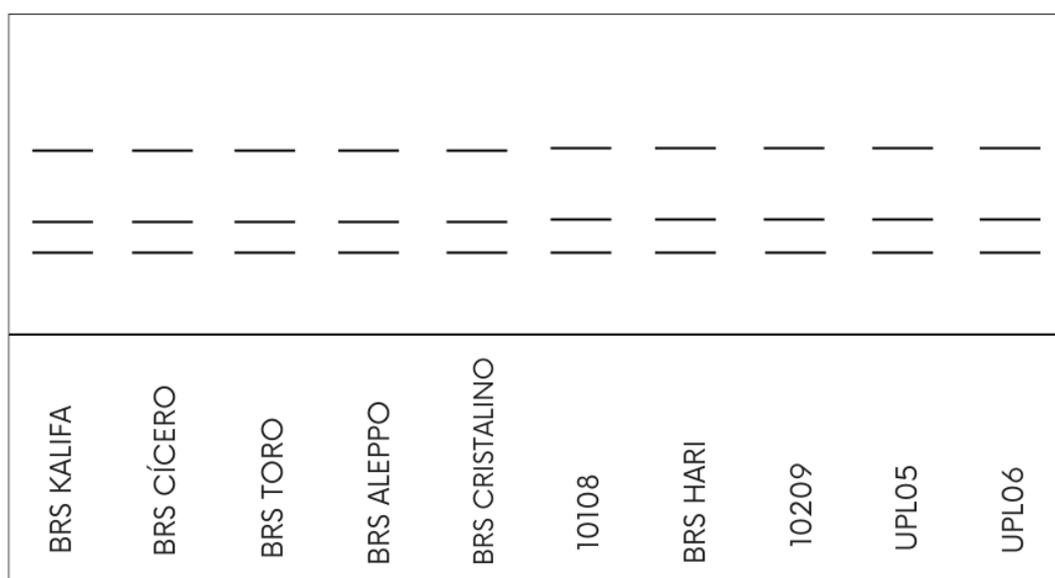
Fonte: Do autor (2024).

A esterase está envolvida na hidrólise de ésteres, e pode estar associada aos processos degenerativos de membranas e é neste contexto que Vieira *et al.* (2006) destacaram a importância deste sistema enzimático como marcador do processo de deterioração de sementes. É um dos marcadores isoenzimáticos mais utilizados na identificação de cultivares. É constituído por um complexo e heterogêneo grupo de enzimas reativas com uma ampla gama de substrato, com alto nível de variabilidade. Isto contribui, sobretudo, para que este sistema enzimático seja um dos mais polimórficos em plantas (Gillespie; Langley, 1974; Scandalios, 1969; Weeden; Wendel, 1990).

Begum *et al.* (2019) observaram padrão polimórfico distinto entre nove cultivares de grão-de-bico. Outros padrões polimórficos foram observados também para cultivares de linhaça (Krulíčková *et al.*, 2002); arroz (Bonow *et al.*, 2007); milho (Salgado *et al.*, 2006); gladiolo (Ferreira *et al.*, 2011); rabanete (Cruz *et al.*, 2014); e milheto (Silva, *et al.*, 2016).

Assim como a catalase, a superóxido dismutase (SOD) é uma importante enzima antioxidante. Participa ativamente do sistema de inativação das ERO's que converte radicais superóxido em peróxido de hidrogênio (Taiz; Zeiger, 2017). No presente trabalho, não foi observado polimorfismo (Figura 10) que possibilitasse distinguir cultivares de grão-de-bico.

Figura 10 – Zimograma da isoenzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de cultivares de grão-de-bico.



Fonte: Do autor (2024).

Falcão e Paula (1994), também não observaram polimorfismo para a distinção de grupos de cultivares de batata-doce por meio da SOD. Assim como Bonow *et al.* (2007), em cultivares de arroz. Já no trabalho de Cruz *et al.* (2014), foi observado polimorfismo alta estabilidade dos padrões desta enzima em diferentes estágios fenológicos na cultura do rabanete. Um polimorfismo de até 50% também foi observado em variedades de coentro utilizando este sistema isoenzimático (Singh, 2015).

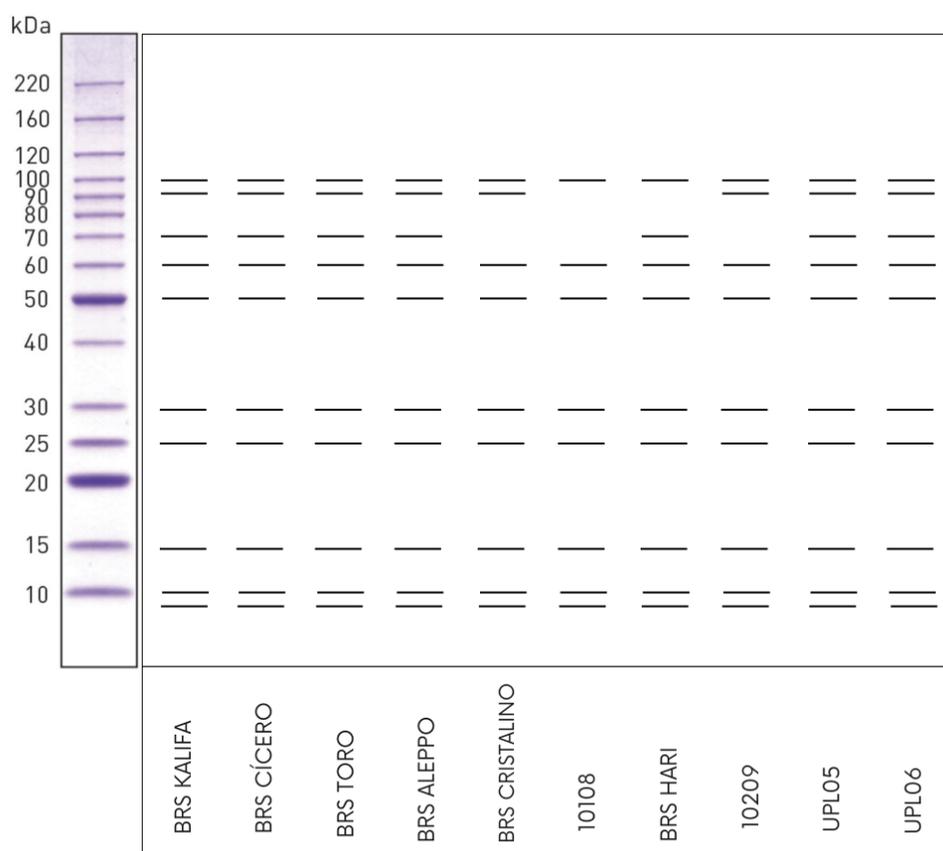
A seguir, estão apresentados os padrões eletroforéticos das proteínas de armazenamento e proteínas resistentes ao calor, obtidos de sementes de cultivares de grão-de-bico. Os padrões eletroforéticos de cada cultivar foram avaliados, utilizando como referência o padrão de proteína da INVITROGEN, contendo 15 padrões de peso molecular entre 10 e 220 kDa. Para as proteínas de armazenamento (Figura 11), foram detectadas cerca de 10 bandas proteicas de pesos moleculares diferentes, que variaram de 100 kDa a 10 kDa. Os perfis proteicos observados para as cultivares 10108 e BRS Hari foram os mais distintos entre as demais cultivares. Para a cultivar 10108 houve ausência das bandas de pesos moleculares de 90 kDa e 70 kDa. Na cultivar BRS Hari, ausência do peptídeo de 90 kDa e presença do peptídeo de 70 kDa, fazendo com que esta seja distinta da cultivar 10108 e das demais cultivares.

Entre as cultivares do grupo kabuli, a BRS Cristalino foi a única que com ausência da banda de peso molecular de 70 kDa. E no grupo desi, esta mesma banda molecular esteve ausente para duas cultivares, a 10209 e a 10108.

A análise de proteínas de armazenamento por meio do sistema eletroforético SDS PAGE é bastante utilizada e recomendada para cultura do grão-de-bico, para a identificação de cultivares e em estudos de diversidade e variabilidade genética. As proteínas de armazenamento em sementes se acumulam significativamente durante o processo de maturação destas, sendo rapidamente mobilizadas durante o processo de germinação (Wakasa; Takaiwa, 2013).

Em trabalhos desenvolvidos por Hameed *et al.* (2012) Jha *et al.* (2012), Begum e Alam (2019), o uso de proteínas de armazenamento foi bastante eficiente para a identificação cultivares de grão-de-bico. Por meio do polimorfismo observado, foi possível distinguir cultivares de maneira precisa e realizar agrupamentos com base nos dados de similaridade genética.

Figura 11 – Zimograma das proteínas de armazenamento em sementes de cultivares de grão-de-bico.



Fonte: Do autor (2024).

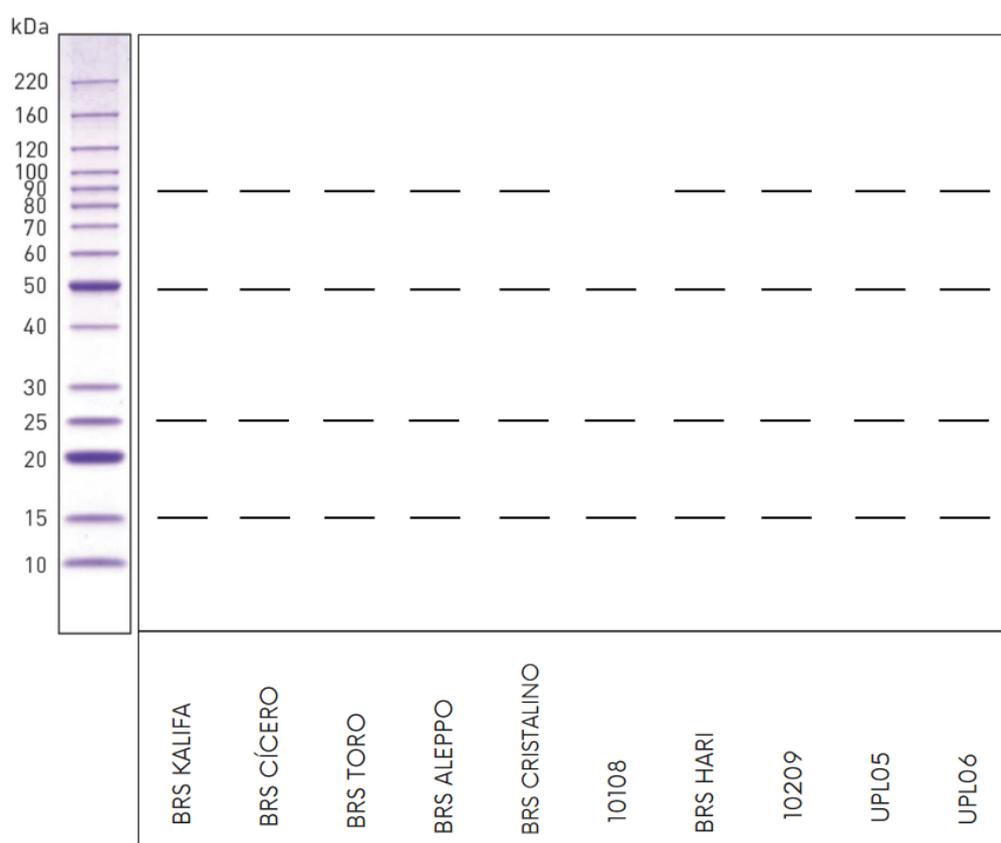
Em sementes de grão-de-bico, as principais proteínas de armazenamento, presentes nas sementes são globulinas (56%), glutelinas (18%), albuminas (12%) e prolaminas (3%) (Chang *et al.*, 2012; Kaur; Prasad, 2022; Nwokolo; Smartt, 1996). Em pesquisas foi possível associar os grupos de proteínas de armazenamento, com faixas de pesos moleculares utilizando-se da técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE. Assim, bandas proteicas de 10, 11 e 12 kDa podem ser identificadas como albuminas (2S) (Vioque *et al.*, 1998), e as bandas de 15, 18, 33, 35, 37 e 50 kDa, atribuídas às proteínas vicilina (7S) (Gueguen, 1991). Além disso, peptídeos com pesos de 24, 25 e 42 podem estar associados às leguminas (11S), enquanto aqueles com tamanhos de 55 e 58 kDa, às glutelinas e bandas de alto peso molecular ~97 kDa podem ser atribuídas às lipoxigenases (Agrawal *et al.*, 2013; Changue *et al.*, 2022).

Para leguminosas, as proteínas de armazenamento mais abundantes são as globulinas, um grupo diversificado de proteínas solúveis em sais. No grão-de-bico estas estão em maior quantidade e, no presente trabalho, foi possível identificar as vicilinas (7S)

e leguminas (11S).

Para as proteínas resistentes ao calor (Figura 12), observou-se baixo polimorfismo. De maneira geral, foram obtidas quatro bandas, que variaram de 90 kDa a 15 kDa. Foi possível separar apenas a cultivar 10108 das demais, pela ausência da banda de peso molecular de 90 kDa. As proteínas resistentes ao calor são relatadas na literatura como marcadores promissores para separação de cultivares. Silva-Mann *et al.* (2004) em estudo de diversidade genética, observou padrão altamente polimórfico das proteínas resistentes ao calor, o que permitiu agrupar e diferenciar cultivares de algodão geneticamente próximos. Resultados similares foram encontrados por Roveri José *et al.* (2004), com elevado nível de polimorfismo e boa estabilidade destas proteínas em sementes de milho, colhidas em diferentes safras e submetidas à métodos de secagem.

Figura 12 – Zimograma das proteínas resistentes ao calor em sementes de cultivares de grão-de-bico.



Fonte: Do autor (2024).

O polimorfismo e a estabilidade das proteínas resistentes ao calor também foi observada por Menezes *et al.* (2008). Estes últimos autores verificaram em sementes de diferentes cultivares de milho polimorfismo e estabilidade destas proteínas para a identificação de cultivares, todavia, apesar de estáveis, verificaram padrões monomórficos em cultivares de algodão, soja e feijão.

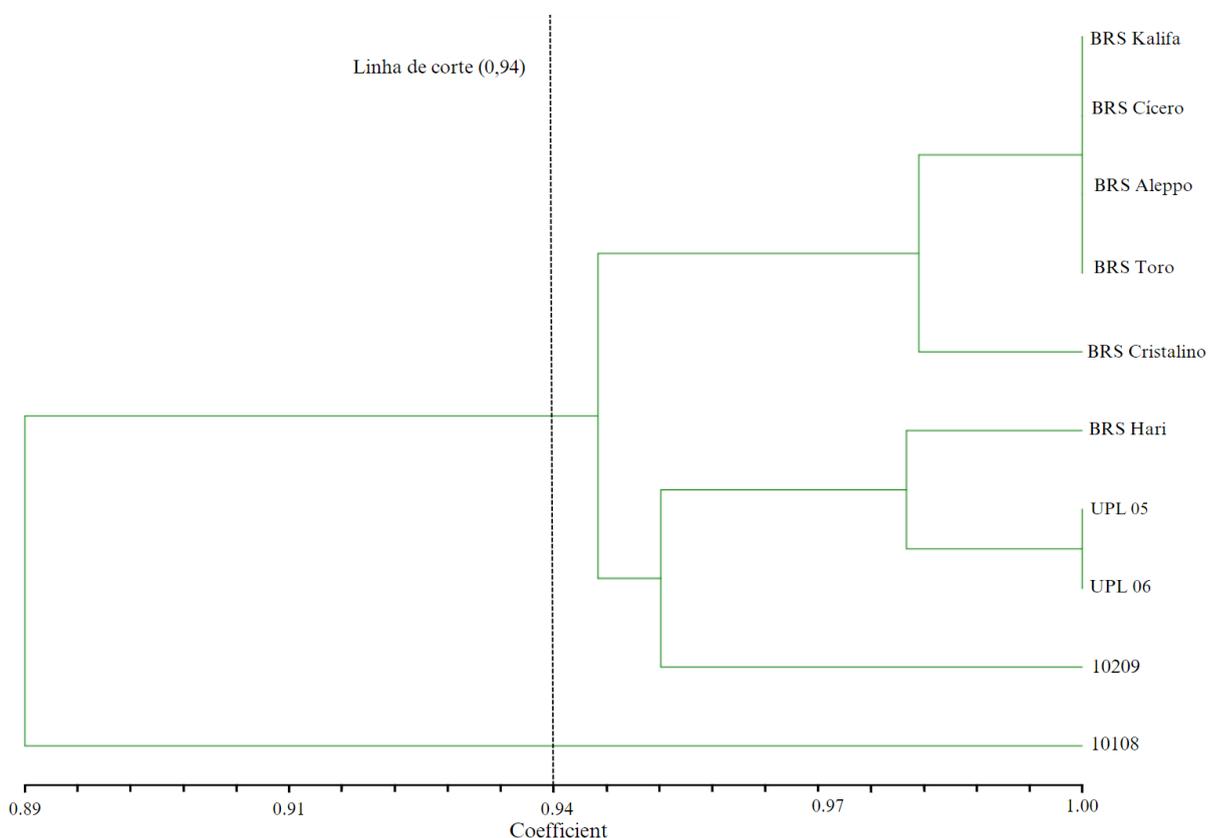
Para Menezes *et al.* (2008) a ineficiência das proteínas resistentes ao calor como descritor, em alguns casos, pode estar ligada à base genética estreita das cultivares avaliadas, fato comum em diversas espécies de plantas autógamas. Também relataram que a falta de condições de estresse durante o desenvolvimento da semente, impede a expressão de alguns alelos que codificam para as proteínas resistentes ao calor, e que poderiam distinguir cultivares.

No agrupamento das cultivares (Figura 13), foi possível observar a formação de dois grupos, sendo um deles formado pela cultivar 10108, e o outro formado pelas demais cultivares com coeficiente de similaridade de 0,89.

Dentro deste último grupo, foram observados dois subgrupos, sendo um destes constituído exclusivamente por cultivares do grupo kabuli, BRS Kalifa, BRS Cícero, BRS Toro, BRS Aleppo e BRS Cristalino, com similaridade de 0,98 e o outro grupo composto por cultivares do grupo desi, BRS Hari, UPL 05, UPL 06 e 10209, com similaridade de cerca de 0,95.

Foram observados coeficientes de similaridade máximos, entre os genótipos BRS Kalifa, BRS Cícero, BRS Aleppo e BRS Toro, do grupo kabuli, e entre os genótipos UPL 05 e UPL 06, do grupo desi. A alta taxa de similaridade pode ser devido à resolução de um número limitado de locos amostrados no genoma para diferenciação dos genótipos por meio de proteínas e/ou em função de as cultivares serem provenientes de parentais comuns. A menor similaridade genética foi observada entre a cultivar 10108 (0,89), do grupo desi, e as demais avaliadas.

Figura 13 – Dendrograma das 10 cultivares de grão-de-bico estudadas, obtido pela análise de agrupamento UPGMA, com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando marcadores de proteínas.

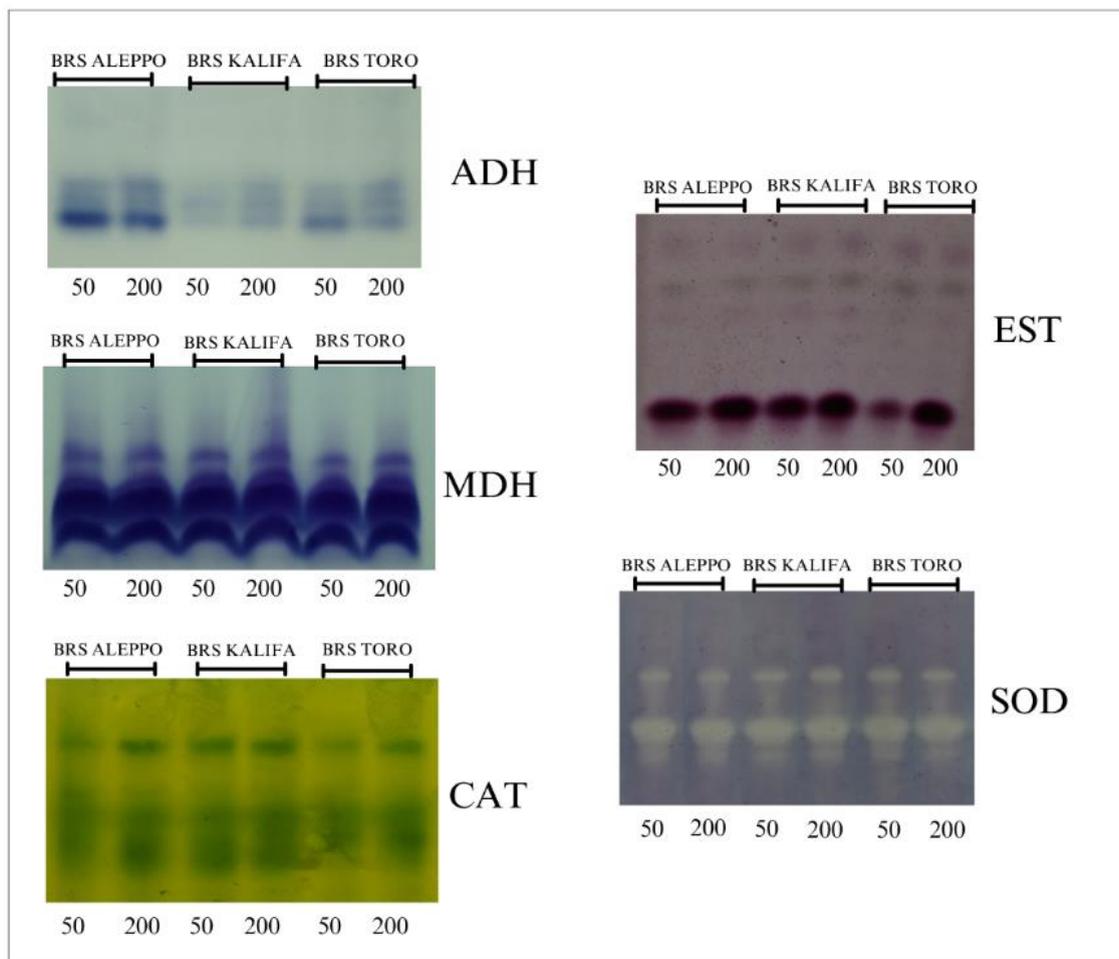


Fonte: Do autor (2024).

Quanto à estabilidade dos sistemas proteicos, isoenzimáticos, envolvendo as proteínas de armazenamento e resistentes ao calor, verificou-se que para as três cultivares de grão-de-bico, BRS Aleppo, BRS Kalifa e BRS Toro, produzidas sob dois níveis de nitrogênio, $50 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ e $200 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, não houve diferenças nos padrões de banda (Figuras 13 e 14).

Com relação aos sistemas isoenzimáticos (Figura 14), verificou-se que os níveis de adubação nitrogenada utilizados no presente trabalho não alteraram a expressão das enzimas para as três cultivares.

Figura 14 – Zimograma das isoenzimas álcool desidrogenase (ADH); malato desidrogenase (MDH); catalase (CAT); esterase (EST) e superóxido dismutase (SOD) de três cultivares de grão-de-bico, produzidas sob dois níveis de nitrogênio 50 Kg ha⁻¹ e 200 kg ha⁻¹.



Fonte: Do autor (2024).

Diferenças foram observadas na intensidade de bandas, todavia, para a identificação de cultivares considera-se a análise qualitativa, presença e ausência de bandas, devido à sua grande variabilidade aos fatores bióticos e abióticos. Imolesi *et al.* (2001) afirmam que estes perfis podem apresentar variáveis dependendo do tecido analisado, da ocorrência de microrganismos, da adubação e das condições ambientais.

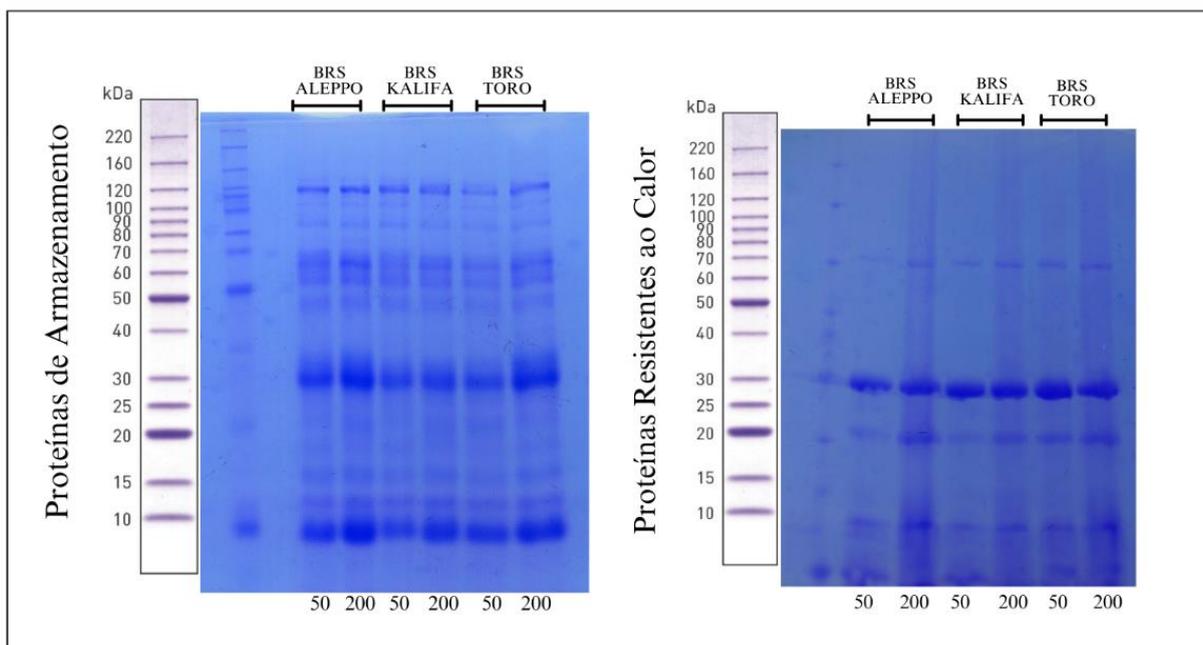
Quando há excessivo fornecimento de nitrogênio, a planta aumenta a síntese de proteínas e a formação de novos tecidos, usando a maior parte dos carboidratos na elaboração de proteínas (Fornasieri-Filho, 1992). Imolesi *et al.* (2001) verificaram que diferentes doses de nitrogênio, quando da produção de sementes milho, influenciaram na expressão da isoenzima catalase. Todavia, o mesmo comportamento não foi observado para

a enzima esterase, cujo padrão manteve-se estável independentemente do aumento das doses de nitrogênio.

Barbosa *et al.* (2022) observaram, em cultivares de cevada, que a expressão da esterase e da malato desidrogenase foram influenciadas quando foram utilizadas diferentes doses de nitrogênio, durante o processo de produção de sementes. A dose mais elevada de nitrogênio, 200 kg N.ha⁻¹, resultou no aumento da expressão e do número de bandas, comparativamente ao observado sob doses baixas (80 kg N.ha⁻¹; 120 kg N.ha⁻¹ e 160 kg N.ha⁻¹).

Para as proteínas de armazenamento e resistentes ao calor (Figura 15), não foram verificadas diferenças nos padrões de bandas para as cultivares analisadas, apresentando, portanto, estabilidade para nas condições testadas para a identificação de cultivares.

Figura 15 – Proteínas de armazenamento e resistentes ao calor de três cultivares de grão-de-bico, produzidas sob dois níveis de nitrogênio 50 Kg.ha⁻¹ e 200 kg.ha⁻¹.



Fonte: Do autor (2024).

Na literatura, verifica-se que as proteínas de armazenamento são conhecidas por serem pouco influenciadas pelo ambiente (Hameed *et al.*, 2012; Kakaei 2021). Rovieri José *et al.* (2004) observaram estabilidade dos padrões de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho, colhidos em diferentes safras e submetidas a diferentes métodos de secagem, quando do uso destes marcadores para a identificação de linhagens. Os autores

ressaltaram que esta estabilidade é fundamental para a identificação de cultivares e certificação da pureza genética de lotes de sementes. Os padrões monomórficos de proteínas resistentes ao calor e de armazenamento observados pode ser explicado pela alta similaridade genética entre as cultivares avaliadas, todas pertencentes ao grupo kabuli.

4.5 Marcadores moleculares SSR

Entre os 50 *primers* SSR testados, 24 apresentaram polimorfismo para a caracterização das cultivares de grão-de-bico (Tabela 10). Os demais *primers* com padrões monomórficos, ou que não se amplificaram foram desconsiderados para o agrupamento por similaridade. Foram consideradas as bandas robustas, sem dúvidas sobre ausências e presenças das mesmas.

Para fins de ilustração, a seguir são apresentados zimogramas por meio dos quais foi possível distinguir o maior número de cultivares avaliadas nesta pesquisa, a partir de ampliações dos *primers* TA 180, TA 11 e TA 203.

Tabela 10 – Pares de oligonucleotídeos iniciadores (*'primers'*) polimórficos em cultivares de grão-de-bico.

Primers	Sequência (5'-3')
AKIN SNF1 related protein kinase Forward	GTGGTTCAGGTGCAGACTTG
AKIN SNF1 related protein kinase Reverse	TCAGAAAGTGCCCATCACGC
TA200 Foward	TTTCTCCTCTACTATTATGATCACCAG
TA200 Reverse	TTGAGAGGGTTAGAACTCATTATGTTT
TA113 Foward	TCTGCAAAAACCTATTACGTTAATACCA
TA113 Reverse	TTGTGTGTAATGGATTGAGTATCTCTT
TA30 Foward	TCATTA AAAATTCTATTGTCCTGTCCTT
TA30 Reverse	ATCGTTTTTCTAAACTAAATTGTGCAT
TA130 Foward	TCTTTCTTTGCTTCCAATGT
TA130 Reverse	GTAAATCCCACGAGAAATCAA
TA135 Foward	TGGTTGGAAATTGATGTTTT
TA135 Reverse	GTGGTGTGAGCATAATTCAA
TA11 Foward	CATGCCATAAACTCAATACAATACAAC
TA11 Reverse	TTCATTGAGGACAATGTGTAATTTAAG
TA117 Foward	GAAAATCCCAAATTTTTCTTCTTCT
TA117 Reverse	AACCTTATTTAAGAATATGAGAAACACA
TA176 Foward	ATTGGCTTAAACCCTCTTC
TA176 Reverse	TTTATGCTTCCTCTTCTTCG

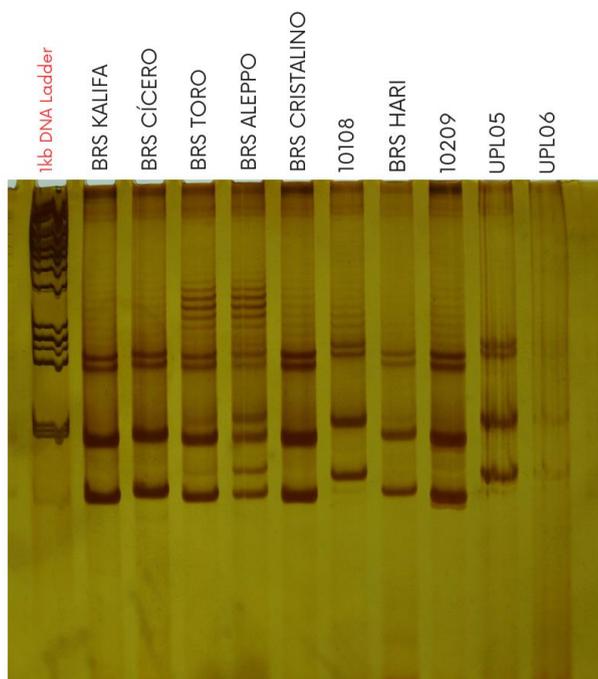
(Conclusão)

Primers	Sequência (5'-3')
TA180 Foward	CATCGTGAATATTGAAGGGT
TA180 Reverse	CGGTAAATAAGTTTCCCTCC
TA203 Foward	ATAAAGGTTTGATCCCCATT
TA203 Reverse	TGTGCATTTCAGATACATGCT
TR20 Foward	ACCTGCTTGTTTAGCACAAT
TR20 Reverse	CCGCATAGCAATTTATCTTC
TR29 Foward	GCCCACTGAAAAATAAAAAG
TR29 Reverse	ATTTGAACCTCAAGTTCTCG
TR59 Foward	AAAAGGAACCTCAAGTGACA
TR59 Reverse	GAAAATGAGGGAGTGAGATG
TAA104 Foward	CCCCTAAATTAACAACATAATGG
TAA104 Reverse	CGGCTTATGAATTTTTATCATTTACAG
TA22 Foward	TCTCCAACCCTTTAGATTGA
TA22 Reverse	TCGTGTTTACTGAATGTGGA
TA118 Foward	ACAAGTCACATGTGTTCTCAATA
TA118 Reverse	GGAAAGGTTAAGAAATTTTACAATAC
CaM0443 Foward	TCGTTTGCATAAGATGGAACA
CaM0443 Reverse	GTACAACCGCCGCAAATATC
CaM0436 Foward	TGAAAATGGAGAAGGATGGG
CaM0436 Reverse	AAGGGGAGGAGATTGAAACG
TA71 Foward	CGATTTAACACAAAACACAAA
TA71 Reverse	CCTATCCATTGTCATCTCGT
TA122 Foward	AATGCTACAAATTATTA AAAACAGTC
TA122 Reverse	AACTTTTAGTGTGCTGACGAGT
TA194 Foward	TTTTTGGCTTATTAGACTGACTT
TA194 Reverse	TTGCCATAAAATACAAAATCC
NCPGR127 Foward	CATAATGCAAGGGCAATTAG
NCPGR127 Reverse	CTCTTATCTTCATGTTGCCG
CaM0317 Foward	TGGCCTAAATGTCTCAGCAA
CaM0317 Reverse	AGAGGCAAACAAGAACCGAA

Fonte: Do autor (2024).

Na Figura 16, encontra-se o padrão de bandas obtido pelos iniciadores TA-180. Foi observado o mesmo padrão para BRS Kalifa, BRS Cícero, BRS Cristalino, BRS Hari e 10209, assim como entre as cultivares 10108 e UPL 05. Por meio destes iniciadores as cultivares BRS Aleppo, BRS Toro, foram diferenciadas das demais.

Figura 16 – Padrões de bandas observados a partir da amplificação do *primer* TA-180 em cultivares de grão-de-bico.

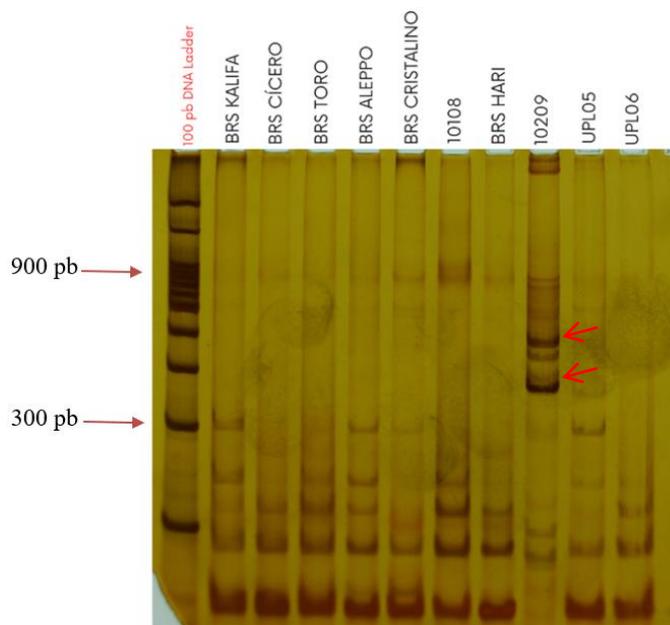


Fonte: Do autor (2024).

O *primer* TA-180 tem sido utilizado em estudos de diversidade genética para a cultura do grão-de-bico. Ao utilizar 20 *primers* SSR, Solanki *et al.* (2022), observaram que por meio do *primer* TA-180 foi possível observar a maior diversidade genética entre os os genótipos avaliados. Ningwal *et al.* (2023) também confirmaram a eficiência do referido *primer* para a distinção de 57 linhagens do grupo desi. Ao investigar o hibridismo em grão-de-bico, Thakur *et al.* (2021), verificaram que, de 51 pares de iniciadores SSR, apenas para o TA-180 (1,2% do total de SSRs) foi observado polimorfismo para a confirmação de plantas híbridas.

Na Figura 17 está o resultado do perfil eletroforético da amplificação do *primer* TA-11. Foi possível observar quatro padrões distintos. Padrões semelhantes foram verificados para as cultivares BRS Kalifa, BRS Aleppo, BRS Cristalino e UPL 05. Também foram verificados padrões similares entre as cultivares BRS Cícero, BRS Toro e UPL 06, assim como para as cultivares 10108 e BRS Hari. O maior número de bandas foi observado para a cultivar 10209, cujos fragmentos variaram entre 900 pb e 400 pb. Utilizando-se deste *primer*, Castro *et al.* (2011) e Kosgei *et al.* (2022) observaram alto nível de polimorfismo entre cultivares para grão-de-bico.

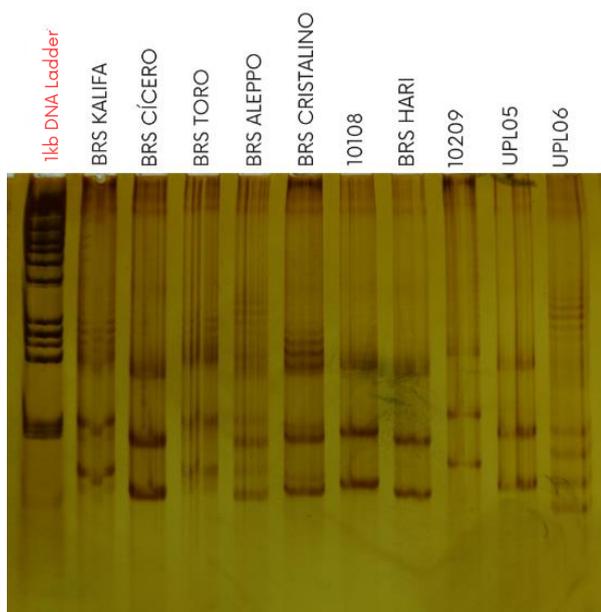
Figura 17 – Padrões de bandas observados a partir da amplificação do *primer* TA-11 em cultivares de grão-de-bico.



Fonte: Do autor (2024).

Pelo *primer* TA-203 (Figura 18), foi possível distinguir todas as cultivares utilizadas neste trabalho. Por isso, este *primer* pode ser considerado recomendado para uso como marcador para diferenciar cultivares de grão-de-bico, seja para o registro nacional de cultivares e/ou para a certificação da pureza genética de lotes de sementes.

Figura 18 – Padrões de bandas observados a partir da amplificação do *primer* TA-203 em cultivares de grão-de-bico.



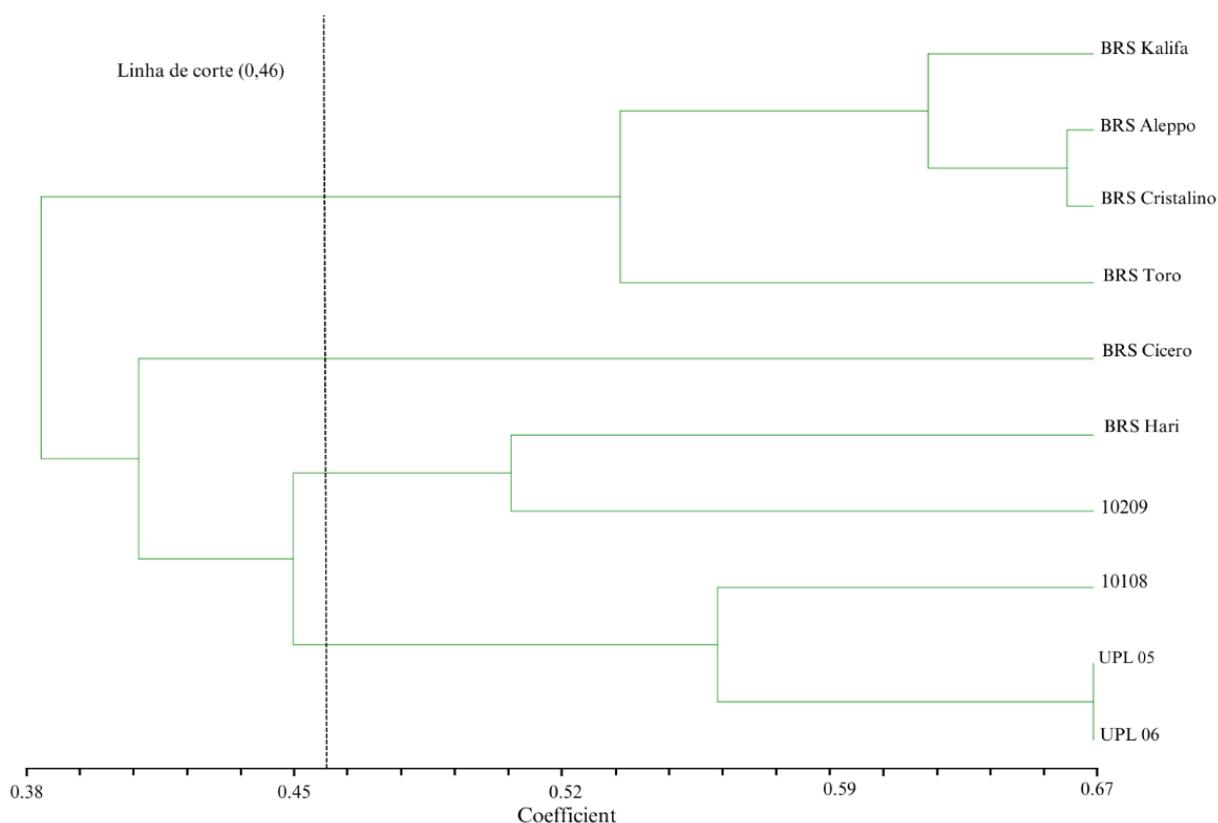
Fonte: Do autor (2024).

Valadez-moctezuma *et al.* (2020), recomendam a utilização do *primer* TA-203 pela eficiência deste na distinção de cultivares de grão-de-bico do germoplasma mexicano. Em trabalho desenvolvido por Südüpak (2013), este *primer* contribuiu para o estudo de variação alélica, com alto valor de conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) em variedades turcas de grão-de-bico.

Em relação ao estudo de similaridade genética (Figura 19), foram formados quatro grupos de cultivares assim constituídos: Grupo 1: BRS Kalifa, BRS Aleppo, BRS Cristalino e BRS Toro; Grupo 2: BRS Cícero; Grupo 3: BRS Hari e 10209 e Grupo 4: 10108, UPL 05 e UPL 06.

O maior valor de similaridade (0,67) foi observado entre as cultivares UPL 05 e UPL 06, podendo inferir que populações em comum possam ter sido utilizadas no desenvolvimento destes materiais. Além disso, o índice de similaridade destas duas cultivares em relação a cultivar 10108, foi de aproximadamente 0,55.

Figura 19 – Dendrograma das dez cultivares de grão-de-bico estudadas, obtido pela análise de agrupamento UPGMA, com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, com base na análise de microssatélites.



Fonte: Do autor (2024).

Embora não tenha sido possível ter acesso aos dados de genealogia de todas as cultivares, foi possível observar que as cultivares BRS Cristalino e BRS Kalifa compartilham do mesmo parental feminino (CNPH 035). A cultivar BRS Cristalino também possui relação com a cultivar BRS Toro, por possuírem em comum, o genitor GB 0528.

Assim como observado na análise proteômica, as cultivares do grupo kabuli, BRS Kalifa, BRS Aleppo, BRS Cristalino e BRS Toro, foram classificadas em um mesmo grupo pela análise por microssatélites. Neste grupo, as cultivares mais relacionadas foram BRS Aleppo e BRS Cristalino com similaridade aproximada de 0,66. Estas duas cultivares tem similaridade aproximada de 0,62 com a cultivar BRS Kalifa. Neste grupo a maior similaridade foi observada para a cultivar BRS Toro, 0,53, em relação às demais cultivares integrantes com as demais cultivares integrantes deste agrupamento. Diferenças dos agrupamentos de similaridade foram observados quando da utilização de proteínas e de DNA por microssatélites. Para a cultivar BRS Cícero, por exemplo, houve valor altos de similaridade desta com as demais cultivares do grupo kabuli, por meio da análise proteômica. No entanto, utilizando-se da técnica SSR, a cultivar BRS Cícero foi uma das menos similares, 0,41, em relação ao grupo das cultivares do grupo desi menos similares.

Ressalta-se que o número de marcadores microssatélites utilizados no presente trabalho foi superior ao número de marcadores utilizados para as proteínas. Portanto, como as regiões do genoma avaliadas por meio destes marcadores são distintas espera-se valores distintos de similaridade quando comparados entre si e, logicamente, quanto maior o número de locos avaliados, maior a precisão da análise por similaridade. Quando da utilização dos marcadores microssatélites, fica evidente a necessidade de se trabalhar com um número maior de *primers*, uma vez que quanto maior o número de *primers* polimórficos, maior será a cobertura do genoma e, conseqüentemente, dados mais seguros e precisos de similaridade poderão ser extraídos.

Para a identificação de cultivares visando a certificação da pureza genética, quanto maior a similaridade, maior a dificuldade de encontrar um marcador que possa ser utilizado para a certificação da pureza genética em lotes de sementes. Diante da portaria nº 502, que prevê a utilização dos marcadores moleculares como descritores, visando o RNC, os marcadores SSRs são ferramentas interessantes que podem colaborar e complementar o depósito de novos materiais junto ao MAPA.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização de cultivares de grão-de-bico pode ser realizada utilizando-se marcadores morfológicos e moleculares de proteínas e de DNA. Contudo, deve-se ressaltar que cada um destes possui limitações e potencialidades que devem ser consideradas quando da utilização destes para inscrições de novos materiais no RNC e aliado a isto, existe dificuldades na definição sobre quais marcadores devem ser usados para distinguir cultivares, de forma correta.

Por meio da portaria MAPA de nº 502, de 19 de outubro de 2022, são estabelecidas as normas para o registro de cultivares. A habilitação de novas cultivares para produção, beneficiamento e comercialização em todo o território nacional, só é possível desde que esta seja claramente distinguível de outras cultivares conhecidas, por margem mínima de descritores homogêneos e estáveis ao longo das gerações. Além disso, a nova portaria prevê que características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas ou moleculares, que sejam herdadas geneticamente, podem ser utilizadas para a identificação de cultivares no RNC. Nesse sentido, a estabilidade e homogeneidade dos descritores, associados à capacidade e segurança destes para a distinção de cultivares tornam-se importantes desafios para quem deseja registrar novas cultivares. a estabilidade dos descritores

Na presente pesquisa, por meio dos marcadores morfológicos em nenhum estágio fenológico foi possível separar todas as cultivares avaliadas. Foi necessário examinar um conjunto de descritores nos diferentes estádios de desenvolvimento para a identificação dos materiais. Para muitas espécies de importância econômica, verifica-se que o uso de descritores morfológicos pode não ser capaz de responder com eficiência e segurança à identidade genética de uma determinada cultivar, devido à inexistência de descritores representativos e/ou devido à alta similaridade genética. Além disso, é importante destacar que os efeitos epistáticos e pleiotrópicos afetam sobremaneira os resultados da identificação de cultivares por meio de descritores morfológicos. Um exemplo disto é quando se utiliza uma característica quantitativa, isto é, quando se tem vários genes controlando uma característica, no ambiente, a estabilidade deste marcador é pequena e, portanto, há grandes chances de não se ter homogeneidade.

De forma similar aos marcadores morfológicos, não foi possível distinguir todas as cultivares por meio de uma única proteína, sejam enzimas, de armazenamento ou resistente ao calor. Foi necessário analisar um conjunto de diferentes proteínas para caracterizar os

genótipos. As proteínas de armazenamento e as proteínas resistentes ao calor são conhecidas por sua maior estabilidade em relação às enzimas. A expressão das enzimas pode sofrer variações em função da condição fisiológica, do estágio de desenvolvimento, da presença de patógenos e do tecido utilizado para a análise. Estes fatores devem ser levados em consideração, pois, os marcadores moleculares de proteínas só poderão ser considerados úteis para a distinção de cultivares visando o RNC, se atenderem à legislação, ou seja, se observada a estabilidade destes descritores.

Por meio dos marcadores moleculares de DNA, é possível distinguir todas as cultivares de grão-de-bico. Em comparação aos marcadores de proteínas, verificou-se maior polimorfismo entre as cultivares, quando da utilização dos marcadores de DNA, utilizando SSR. Este resultado era esperado, porque, nas análises de DNA se trabalha dentro de regiões do genoma que nem sempre codificam para uma proteína, sendo esta, uma vantagem quando se utiliza marcadores desta natureza, ou seja, é comum marcadores SSR estarem em regiões introns dos genomas, isto é, caracterizam-se como sequências não traduzidas. O uso destes marcadores possibilitou resultados de fácil interpretação, sendo possível identificar com clareza e precisão um grande número de cultivares, quando comparado aos descritores morfológicos e proteicos. Por meio do iniciador TA-203, por exemplo, foi possível diferenciar todas as cultivares de grão-de-bico utilizadas neste estudo.

Considerando as diretrizes previstas por lei, os marcadores de DNA tornam-se ferramentas importantes para o registro de cultivares, visto que, são estáveis e portanto, não são alterados em função das condições ambientais. Além disso, há uma maior probabilidade de distinguir materiais muito similares

Ressalta-se que a nova normativa, para o registro de cultivares, a portaria de nº 502, trouxe avanços ao preconizar o uso de descritores de diferentes naturezas para fins de registro de cultivares. Isto é importante principalmente quando se considera que quanto maior o número de descritores utilizados, maiores são as probabilidades de sucesso para a identificação de cultivares e certificação da pureza genética. Entretanto, verifica-se que uma instrução normativa se faz necessária para complementar esta atual portaria, visto que, existem questões que devem ser mais esclarecidas, como por exemplo, sobre a indicação e o detalhamento de quais descritores bioquímicos e fisiológicos serão aceitos para identificar cultivares, visto que, estes devem ser herdados geneticamente. Um outro ponto a ser considerado é de que nas normas atuais, o obtentor não possui obrigatoriedade em depositar as informações sobre os marcadores utilizados, mas apenas apresentá-los no ato de registro.

Isto influencia a disponibilidade dos relatórios de descritores das espécies/cultivares, que no caso do grão-de-bico, por exemplo, não encontra-se disponível no site do Ministério da Agricultura.

O uso de novas tecnologias é uma tendência crescente e tem transformado significativamente toda a agricultura. Não há dúvidas de que ferramentas de análise de imagens e de inteligência artificial, são promissoras e podem contribuir para a distinção de cultivares. No presente trabalho, o uso da análise de imagens, por meio do sistema GroundEye® foi eficiente para distinguir sementes de cultivares de grão-de-bico, que possuem características fenotípicas bastante similares. A Argentina tornou-se o primeiro país do mundo a utilizar oficialmente, por meio de uma agência estatal, um método de inteligência artificial para identificação varietal no controle comercial de sementes de trigo e cevada. É importante que pesquisas sejam realizadas para a validação de novas metodologias, que sejam seguras para a distinção de cultivares, e que possam ser recomendadas pelos órgãos oficiais para o registro de cultivares.

6 CONCLUSÃO

As cultivares de grão-de-bico podem ser distintas e identificadas utilizando uma combinação de marcadores morfológicos, proteicos e de DNA. A análise de imagem de sementes pelo sistema GroundEye® permite uma caracterização precisa e diferenciação entre as cultivares de grão-de-bico, sendo uma abordagem valiosa para enriquecer o registro de informações das cultivares no RNC. A fase de desenvolvimento mais apropriada para a avaliação da pureza genética varia conforme a cultivar. O primer TA-203 destaca-se como um marcador importante para distinguir as cultivares brasileiras de grão-de-bico, contribuindo assim para o registro das mesmas.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, M. *et al.* Morphological and Molecular genetic diversity analysis of chickpea genotypes. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 20, n., p. 1062-1070. 2018.
- AGRAWAL, L. *et al.* Comparative proteomics reveals a role for seed storage protein AmA1 in cellular growth, development, and nutrient accumulation. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 11, p. 4904-4930, 2013.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1998. 574p.
- ANDRADE, V. **Marcadores morfológicos e moleculares na identificação e distinção de off-type em campos de produção de sementes de soja**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.
- ARAÚJO, A. V. *et al.* Quality of the seeds of different genotypes of chickpea produced in the North of Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1031-1037, 2010.
- ARTIAGA, O. P. *et al.* Avaliação de genótipos de grão-de-bico em cultivo de sequeiro nas condições de Cerrado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, p. 102-109, 2015.
- ATANASOVA, D.; MIHOV, M. Inheritance of flower color and leaf shape of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 12, n. 4, p. 521, 2006.
- AQUINO, M. L. P. *et al.* Caracterização estrutural e funcional das HSP70 no genoma do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*): Uma análise in silico. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 12, 2023.
- AVELAR, R. I. S. *et al.* Yield of chickpeas sown at different times. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 4, p. 900-906, 2018.
- BAKHSH, A.; ARSHAD, M.; HAQQANI, A. M. Effect of genotype x environment interaction on relationship between grain yield and its components in chickpea [*Cicer arietinum* (L.)]. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, n. 3, p. 683, 2006.
- BARBOSA, B. S. *et al.* Doses de nitrogênio em cevada: rendimento e qualidade de sementes. **Revista Thema**, v. 21, n. 2, p. 402-414, 2022.
- BEGUM, K. N.; ALAM, S. S. Genetic diversity in nine chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties based on different molecular markers. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 48, n. 1, p. 195-203, 2019.
- BELLEMOU, D. *et al.* Genetic diversity and population structure of Algerian chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes: use of agro-morphological traits and molecular markers linked or not linked to the gene or QTL of interest. **Crop and Pasture Science**, v. 71, n. 2, p. 155-170, 2020.
- BICER, B. T.; SAKAR, D. Inheritance of pod and seed traits in chickpea. **Journal of Environmental Biology**, v. 31, n. 5, p. 667-669, 2010.

BISWAL, M. *et al.* The exploration of varietal characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes based on morphological markers. **The Pharma Innovation Journal**, v. 10 n.12 p. 2466-2473, 2021.

BONOW, S. *et al.* Caracterização morfológica de cultivares de arroz visando à certificação da pureza varietal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 619-627, 2007.

BRANDÃO JUNIOR, D. S. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

BRASIL. Decreto 10.586 de 18 de dezembro de 2020. Regulamenta a Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças. SNSM, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 jul. 2004. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Decreto-lei nº 9456 de 25 de abril de 1997. Lei de Proteção de Cultivares. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n 79, p. 8241-8246, 28 de abr. 1997. Seção 1.

BRASIL. Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 6 ago. 2003. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 abr. 1997b. Seção 1, p. 25162.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro Nacional de Cultivares – RNC**. Disponível em: <<https://bitly.ws/3cZsw>>. Acesso em: 12 jan. 2024.

BRASIL. Portaria nº 502, de 19 de outubro de 2022. Estabelece as normas para a inscrição de cultivares e de espécies no Registro Nacional de Cultivares - RNC. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 out. 2022. Seção 1, p. 3.

BRASIL. Portaria nº 538, de 20 de dezembro de 2022. Estabelece as normas para a produção, a certificação, a responsabilidade técnica, o beneficiamento, a embalagem, o armazenamento, a amostragem, a análise, a comercialização e a utilização de sementes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 out. 2022. Seção 1, p. 3.

CAROVIĆ-STANKO, K. *et al.* Efficiency of morphological trait descriptors in discrimination of *Ocimum basilicum* L. accessions. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 145, n. 2, p. 298-305, 2011.

CARVALHO M. A. **Germplasm characterization of Arachis pintoi Krap. and Greg. (Leguminosae)**. PhD Thesis, University of Florida, USA. 2004.

CARVALHO, S. I. C. *et al.* **Fenologia do grão-de-bico tipo Kabuli**. Comunicado técnico, Embrapa 1 ed, 2021.

- CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Registro e proteção de cultivares pelo setor público: a experiência do programa de melhoramento de Capsicum da Embrapa Hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 135-138, 2009.
- CASTRO, P. *et al.* Identification of chickpea cultivars by microsatellite markers. **The Journal of Agricultural Science**, v. 149, n. 4, p. 451-460, 2011.
- CATÃO, H. C. R. M. *et al.* Physiological and isozyme alterations in lettuce seeds under different conditions and storage periods. **Journal of Seed Science**, v. 38, p. 305-313, 2016.
- CHAIM, A. *et al.* Linkage of the A locus for the presence of anthocyanin and fs10. 1, a major fruit-shape QTL in pepper. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 889-894, 2003.
- CHANG, L. *et al.* Plant proteins from green pea and chickpea: Extraction, fractionation, structural characterization and functional properties. **Food Hydrocolloids**, v. 123, p. 107-165, 2022.
- CHANG, Y. W. *et al.* Isolation and characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed protein fractions. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 618-625, 2012.
- CHO, S. *et al.* Mapping genes for double podding and other morphological traits in chickpea. **Euphytica**, v.128 n.2, p. 285-292. 2002.
- COBOS, M. *et al.* Comparative seed storage protein profiling of Kabuli chickpea genotypes **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 2, p. 703-710, 2009.
- COSTA, E. X. **Registro nacional de cultivares (RNC): orientações e informações técnicas.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 18p, 2007.
- COSTA, L. S. *et al.* Caracterização de genótipos de Capsicum spp. por técnicas multivariadas no sul do Piauí. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 97371-97385, 2020.
- CRUZ, S. M. *et al.* Molecular characterisation of radish cultivars. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 815-822, 2014.
- DABA, K. *et al.* Effect of temperature and photoperiod on time to flowering in chickpea. **Crop Science**, v. 56, n. 1, p. 200-208, 2016.
- DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, v. 53, n. 1-3, p. 31-45, 1997.
- EL-DENARY, M. *et al.* Morphological markers for early selection in strawberry breeding programs. **Alexandria Science Exchange Journal**, v. 37, n. April-June, p. 102-115, 2016. **Euphytica**, v. 113, n. 3, p. 259-263. 2000.
- FALCÃO, T. M.; PAULA, A. P. O. Caracterização de cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) através da separação eletroforética de proteínas de raízes tuberosas. **Cadernos Ômega. Série Biologia**, Recife, n. 4, p. 103-116, 1994.
- FAROOQ M. *et al.* Heat stress in grain legumes during reproductive and grain-filling phases. **Crop and Pasture Science**, v. 68, p. 985-1005. 2017.

FERREIRA, C. A. *et al.* Identificação de cultivares e certificação da pureza genética de gladiolo por meio de marcadores morfológicos. **Ciência e Agrotecnologia**, vol. 35, p. 692-700, 2011.

FERREIRA, J. J. *et al.* Determination of the out crossing rate of *Phaseolus vulgaris* L. using seed protein markers. **Euphytica**, v. 113, n. 3, p. 259-263. 2000.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1998. 220 p.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. **Food and agriculture data**. In: FAOSTAT. Rome, Italy, 2020. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em 24 jan. 2024.

FORNASIERI FILHO, Domingos. **A cultura do milho**. Funep, 1992.

GAUR P. M. *et al.* Chickpea Seed Production Manual. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: **International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics**, v.28. 2010

GAUTAM, A. K. *et al.* Biochemical and functional properties of a lectin purified from the seeds of *Cicer arietinum* L. **3 Biotech**, v. 8, n. 6, p. 1-11,

GAYATRIDEVI, S. *et al.* Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 154-161, 2012.

GEDIYA, L. N. *et al.* Characterization of chickpea genotypes based on morphological traits. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 4, p. 3008-3015, 2018.

GETAHUN, T. *et al.* Molecular genetic diversity and population structure in Ethiopian chickpea germplasm accessions. **Diversity**, v. 13, n. 6, p. 247, 2021.

GHAFFARI, P. *et al.* Genetic diversity and geographical differentiation of Iranian landrace, cultivars, and exotic chickpea lines as revealed by morphological and microsatellite markers. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.20, n. 2, p. 225-233, 2014.

GHAFOOR, A. *et al.* Inter-relationship between SDS-PAGE markers and agronomic traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v. 35, n. 4, p. 613-624, 2003.

GHAFOOR, A. *et al.* Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS- PAGE. **Euphytica**, v. 123, n. 3, p. 367-378, 2002.

GHRIBI, A. M. *et al.* Structural, functional, and ACE inhibitory properties of water-soluble polysaccharides from chickpea flours. **International journal of biological macromolecules**, v. 75, p. 276-282, 2015.

GILLESPIE, J. H.; LANGLEY, C. H. general model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics, Pittsburgh**, v.76, n.4, p.837-887, 1974.

GIORDANO, L. B.; NASCIMENTO, W. M. **Grão-de-bico Cícero, Sabor e qualidade.** Julho, 2005.

GOMES, J. *et al.* Alcohol dehydrogenase isoenzymes in chickpea cotyledons. **Phytochemistry**, v. 21, n. 6, p. 1219-1224, 1982.

GU, H. *et al.* Identification and characterization of a LEA family gene CarLEA4 from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 3565–3572, 2012.

GUEGUEN J. (1991). **Proteínas de ervilha e fababeam. In: Hudson BJJ (ed) Desenvolvimento em proteínas alimentares.** Elsevier, Londres, pp 35–78

GUPTA, N.; BHAGYAWANT, S. S. RAPD analysis in kabuli chickpea seed accessions. **Innovare Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 4, p. 6-9 2021.

GUPTA, N. *et al.* Multivariate analysis based on nutritional value, antinutritional profile and antioxidant capacity of forty chickpea genotypes grown in India. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 7, n. 3, p. 1000600, 2017.

HAJIBARAT, Z. *et al.* Characterization of genetic diversity in chickpea using SSR markers, start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved DNA-derived polymorphism (CDDP). **Physiology and molecular biology of plants**, v. 21, n. 3, p. 365-373. 2015.

HAMEED, A. *et al.* Comparative seed storage protein profiling of Kabuli chickpea genotypes **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 2, p. 703-710, 2009.

HAMEED, A. *et al.* Genotypic variability and mutant identification in *Cicer arietinum* L. by seed storage protein profiling. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, n. 4, p. 1303-1310, 2012.

HASAN, M. T.; DEB, A. C. Inheritance study of flower color in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Indian Journal of Agricultural Research**, v. 47, n. 5, p. 445-448, 2013.

HEGDE, V. S. *et al.* Genetics and genomics approaches to enhance adaptation and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in semi-arid environments. **SABRAO Journal of Breeding & Genetics**, v. 50, n. 2, 2018.

HOPTSII, T. *et al.* Peculiarities of malate dehydrogenase isoenzyme composition and enzymatic activity in amaranth varieties and varietal populations of different ripeness groups. **AgroLife Scientific Journal**, v. 12, n. 1, p. 97-104, 2023.

HOSKEM, B. C. S. *et al.* Productivity and quality of chickpea seeds in Northern Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 12, n. 3, p. 261-268, 2017.

HOSSAIN, S. *et al.* Inheritance of Seed Size in Chickpea ('*Cicer arietinum*' L.) and Identification of QTL Based on 100-seed Weight and Seed Size Index. **Australian Journal of Crop Science**, v. 2, pág. 126-135, 2010.

IBPGR, ICRISAT & ICARDA. **Descriptors for chickpea (*C. arietinum* L.).** Int Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy; Int Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, India and Int Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria. 1993.

IMOLESI, A. S. *et al.* Influência da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica das sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 5, p. 1119-1126, 2001.

IMTIAZ, M. *et al.* Molecular genetic diversity and linked resistance to ascochyta blight in Australian chickpea breeding materials and their wild relatives. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.59, n. 6, p. 554-560, 2008.

JANGHEL, D. K. *et al.* Genetic Diversity Assessment in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) through Agro-morphological and ISSR Molecular Markers. **Legume Research-An International Journal**, v. 1, p. 8, 2021.

JHA, U. C. *et al.* Wide and intra-specific variation in total seed protein in chickpea (*Cicer arietinum* L.) hybrids through SDS-PAGE. **Madras Agricultural Journal**, v. 99, n. apr-jun, p. 1, 2012.

JOSHI, M. A. *et al.* Cultivar identification and diversity analysis based on morphological descriptors and image analysis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Legume Research-An International Journal**, v. 41, n. 5, p. 647-655, 2018.

KAKAEI, M. Study of relationship among seed proteins pattern with quantitative traits in some of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **Iranian Journal Pulses Research**, v. 10, n. 1, p. 12-27, 2019.

KAUR, R.; PRASAD, K. Effect of malting and roasting of chickpea on functional and nutritional qualities of its protein fractions. **International Journal of Food Science & Technology**, 2022.

KAUR, R.; PRASAD, K. Technological, processing and nutritional aspects of chickpea (*Cicer arietinum*) – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 448-463, 2021.

KAUR, S. *et al.* Exploration of biochemical and molecular diversity in chickpea seeds to categorize cold stress-tolerant and susceptible genotypes. **Acta physiologiae plantarum**, v. 34, p. 569-580, 2012.

KAUR, S. *et al.* Exploration of biochemical and molecular diversity in chickpea seeds to categorize cold stress-tolerant and susceptible genotypes. **Acta Physiologiae Plantarum** v. 34, p. 569–580 2012.

KENENI G. *et al.* Germplasm Accessions from Different Geographical Origins as Revealed by Microsatellite Markers. **Plant Molecular Biology Reporter** 30, 654–665 2012.

KHAMASSI, K. *et al.* Morphological and molecular diversity of Tunisian chickpea. **European Journal of Horticultural Science**, v. 77, n. 1, p. 31. 2012

KHAN, M. A. *et al.* Field performance and genetic diversity of chickpea genotypes. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 18, n. 4, p. 683-688. 2016.

KIVRAK, K. G. *et al.* Integration of extra-large-seeded and double-podded traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 901, 2020.

KONAREV, V. G.; GAVRILJUK, I. P. Biochemical identification of varieties. **Int Seed Testing Assoc and NI Vavilov All-Union Inst Plant Ind, Leningrad**, 1988.

KOSGEI, A. J. *et al.* Introgression of drought tolerance root traits into Kenyan commercial chickpea varieties using marker assisted backcrossing. **African Crop Science Journal**, v. 30, n. 1, p. 31-50, 2022.

KRULÍČKOVÁ, K. *et al.* Identification of linseed and linseed cultivars using isoenzymatic markers. **Biologia Plantarum**, v. 327-336, 2002.

KUMAR, S. *et al.* Growth and metabolic responses of contrasting chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes to chilling stress at reproductive phase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 779–787, 2011.

KUMARI, R. *et al.* Isozyme analysis based genetic purity assessment of single cross hybrid and its parental line in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 4S, p. 425-429, 2018.

LANZA, M. A. *et al.* Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2000.

LIMA FILHO, O. F. **Pulses e o grão-de-bico: importante mercado mundial para o Brasil**. 2019. Elaborada por Embrapa. Disponível em: <<https://bit.ly/3SZV90m>>. Acesso em: 07 maio. 2022.

LIMA, C. E. P. *et al.* **Relatório de avaliação dos impactos de tecnologias geradas pela Embrapa**, Grão-de-bico Aleppo – Embrapa Hortaliças. 2019. Disponível em: <https://bs.sede.embrapa.br/2019/relatorios/hortaliças_grao-de-bicoaleppo.pdf>. Acesso em: 07 maio 2022.

LIOI, L. F. *et al.* Variation and genomic polymorphism of lectin-related protein in Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) seed. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 46, n. 2, p. 157-182. 1999.

MAATALLAH, J. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. **Journal of applied microbiology**, v. 93 n. 4, p. 531-540. 2002.

MADRUGA, F. B. *et al.* Pulse seeds: current situation and perspectives. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, 2021.

MADURAPPERUMAGE, A. *et al.* Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as a Source of Essential Fatty Acids—A Biofortification Approach. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 734980, 2021.

MAJUMDER, D. A. N. *et al.* Analysis of genetic diversity in mango (*Mangifera indica* L.) using isozymetic polymorphism. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 87, p. 15310-15323, 2012.

MALIK, S. *et al.* Assessment of genetic variability and interrelationship among some

agronomic traits in chickpea. **International Journal of Agriculture and biology**, v. 12, n. 1, p. 81-85, 2010.

MANDAL, A. B. *et al.* Isoenzyme markers in varietal identification of banana. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, p. 599-604, 2001.

MARCON, G. **Eletroforese no estudo genético das plantas**: revisão. Piracicaba: ESALQ, 1986. 45 p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. (FEALQ. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz), Piracicaba, 2.ed. p. 495, 2015.

MARKET, C.; F. MOLLER. Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.45, p.753-763, 1959.

MELO, R. A. *et al.* Variabilidade genética em progênies de meios-irmãos de coentro. **Horticultura Brasileira** v. 27, n. 3, jul.-set. 2009.

MELO, S. G. F *et al.* Dormancy and evaluation of the physical-physiological quality in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] seeds by image analysis. **Journal of Seed Sciences**, v. 44, p. 43, 2022.

MENEZES, M. *et al.* Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, p. 111-122, 2008.

MILLAN, T. A linkage map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) based on populations from Kabuli× Desi crosses: location of genes for resistance to fusarium wilt race 0. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 7, p. 1347-1353, 2005.

MILLETT, J. *et al.* Geographic variation in Sundew (*Drosera*) leaf colour: plant–plant interactions counteract expected effects of abiotic factors. **Journal of Biogeography**, v. 45, n. 3, p. 582-592, 2018.

MIR, R. R. *et al.* SSR markers in revealing extent of genetic diversity and phylogenetic relationships among chickpea core collection accessions for Western Himalayas.. Available: **Research Square**, 2022.

MISHRA, G. P. *et al.* Morphological, molecular, and biochemical characterization of a unique lentil (*Lens culinaris* medik.) genotype showing seed-coat color anomalies due to altered anthocyanin pathway. **Plants**, v. 11, n. 14, p. 1815, 2022.

MORENO, M.T.; CUBERO, J. I. VARIATION IN *Cicer arietinum* L. **Euphytica**, v.27, p. 465–485, 1978.

MURPHY, R. W.; *et al.* Proteins I: isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C. **Molecular systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 45-126.

NAMRATA, B. *et al.* Inheritance of flower colour in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Trends in Biosciences**, v. 10, n. 3, p. 1046-1048, 2017. , v. 10, n. 3, pág. 1046-1048, 2017.

NASCIMENTO, W. M. *et al.* **Cultivo do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.)**. Brasília, DF: Embrapa - CNPH, 1998. 14p. Disponível em:

NASCIMENTO, W. M. **Hortalças leguminosas**. Embrapa Hortalças, Brasília, p. 232, 2016.

NGUYEN, T. T. *et al.* Genetic diversity estimates in *Cicer* using AFLP analysis. **Plant Breeding**, v. 123, n. 2, p. 173-179. 2004.

NINGWAL, R. *et al.* Identification of polymorphic SSR markers and diversity analysis in a set of desi chickpea genotypes. **Biological Forum – An International Journal**. p. 45-51, 2023.

NWOKOLO, Emmanuel; SMARTT, Joseph (Ed.). **Food and feed from legumes and oilseeds**. London: Chapman & Hall, 1996.

PADILHA, L. *et al.* **Avaliação da pureza genética em sementes de milho utilizando marcadores microssatélites**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003. 3p

PAKSERESHT, F. *et al.* Comparative assessment of ISSR, DAMD and SCoT markers for evaluation of genetic diversity and conservation of landrace chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes collected from north-west of Iran. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, n. 4, p. 563-574, 2013.

PARAISO, H. A. **Produção e qualidade de sementes de genótipos de grão-de-bico em diferentes épocas de plantio no Norte de Minas Gerais**. 2019. Dissertação de Mestrado. (Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 12. ed. São Paulo, Nobel, 1987. 466p. **Plant Molecular Biology Reporter** 30, 654–665 2012.

PUNTEL, S. *et al.* Non-destructive models for leaf area estimation in chickpea cultivars (*Cicer arietinum* L.). **Revista Ceres**, v. 70, p. e70518, 2023.

QUEIROGA, V. de P.; GIRÃO, Ê. G.; ALBUQUERQUE, E.M.B de. **Grão de bico (*Cicer arietinum* L.): Tecnologias de plantio e utilização**. 1.ed. Campina Grande: AREPB, 2021. 199f.

RAHELEH, R. *et al.* Use of biochemical indices and antioxidant enzymes as a screening technique for drought tolerance in Chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.). **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 39, p. 5372-5380, 2012.

RAJKUMAR, M. S. *et al.* Genome resequencing reveals DNA polymorphisms associated with seed size/weight determination in chickpea. **Genomics**, v. 113, n. 3, p. 1458-1468, 2021.
RAMAKRISHNA, G. *et al.* Genome wide identification and characterization of small heat shock protein gene family in pigeonpea and their expression profiling during abiotic stress conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 197, p. 88-102, 2022.

RAMALHO, M. A. P. *et al.* **Genética na agropecuária**. 5 ed. rev. Editora UFLA, Lavras, MG.2012.

RATHOD, V. L. *et al.* Inheritance of some morphological characters in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 12, n. 4, p. 1442-1447, 2021.

RAZA, H. *et al.* An overview of physicochemical composition and methods used for chickpeas processing. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 7, n. 5, p. 495-500, 2019.

ROORKIWAL, M. *et al.* Genome-enabled prediction models for yield related traits in chickpea. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1666, 2016.

ROVERI JOSÉ, S. C. B. *et al.* Controle genético da tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 03. 2004.

SALGADO, K. C. P. C. *et al.* Genetic purity certificate in seeds of hybrid maize using molecular markers. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, p. 169-175, 2006.

SANT, V. J. *et al.* Potential of DNA markers in detecting divergence and in analysing heterosis in Indian elite chickpea cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, 98(8), 1217-1225. 1999.

SANTOS, G. G. **Divergência genética e seleção de variedades locais e cultivares de feijão com base em descritores morfológicos, agronômicos, tecnológicos e minerais**. 2020. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2020.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, n.1, p.37-39, 1969.

SEFERA, T. *et al.* Characterisation and genetic diversity analysis of selected chickpea cultivars of nine countries using simple sequence repeat (SSR) markers. **Crop and Pasture Science**, v. 62, n. 2, p. 177-187, 2011.

SERRET, M. D. *et al.* Assessment of genetic diversity of cultivated chickpea using microsatellite-derived RFLP markers: Implications for origin. **Plant Breeding**, v. 116, n. 6, p. 573-578, 1997.

SETHY, N. K. *et al.* Development of microsatellite markers and analysis of intraspecific genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 8, p. 1416-1428, 2006.

SEYEDIMORADI, H. *et al.* Agro- morphological description, genetic diversity and population structure of chickpea using genomic-SSR and ESR-SSR molecular markers. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 483-495. 2019.

SHARMA, K. *et al.* Role of Molecular Markers in Identification and Characterization of Chickpea Variety. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 44 n. 1, p. 51-59. 2022.

- SHARMA, R. D. Algumas informações sobre a cultura de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). 1984. Planaltina, DF. Embrapa. 20p. (**Circular Técnica, nº18**).
- SHI, H. *et al.* Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) confers both abiotic and biotic stress resistance in Arabidopsis. **Plant Science**, v. 262, p. 24-31, 2017.
- SIDDIQUE K. H. M. Heat stress in grain legumes during reproductive and grain-filling phases. **Crop and Pasture Science**, v. 68, 985-1005. 2017.
- SILVA, A. A. *et al.* Enzymatic and Microsatellite Markers for the Characterization of Millet Cultivars. **International Journal of Current Research**, v. 8, n. 08, p.36623-36628, 2016
- SILVA, E. A. A. *et al.* Padrões eletroforéticos de isoenzimas em coleótilos de milho em associação com microorganismos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p. 176-181, 1998.
- SILVA-MANN, R. *et al.* Varietal diversity in cotton based on seed protein profile extracted at high temperature. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, p. 227-231, 2004.
- SINGH, F.; DIWAKAR, B. **Chickpea Botany and Production Practices Skill Development Series no. 16** Compiled by Training and Fellowships Program ICRISAT.1995.
- SINGH, R. K. *et al.* Application of isozymes for identification of coriander (*Coriandrum sativum*) varieties. **BIOINFOLET-A Quarterly Journal of Life Sciences**, v. 12, n. 1b, p. 232-234, 2015.
- SINGH, R. *et al.* Assessment of genetic diversity in chickpea cultivars using RAPD, AFLP and STMS markers. **Journal of Genetics and Breeding** 57, 165-74. 2003.
- SINGH, R.; MATTA, N. K. Chickpea seed proteins as affected by mineral supply levels. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 77-79, 2005.
- SINGH, R.; SINGHAL, V.; RANDHAWA, G. J. Molecular analysis of chickpea (*Cicer arietinum* L) cultivars using AFLP and STMS markers. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 167-171, 2008.
- SINGH, S.; *et al.* Inheritance of anthocyanin pigmentation in flower and other plant parts in the genus *Cicer*. **Indian journal of genetics and plant breeding**, v. 66, n. 03, p. 237-238, 2006.
- SOLANKI, R. S. *et al.* Análise da diversidade genética em genótipos de grão-de-bico kabuli (*Cicer arietinum* L.) com base em características quantitativas e marcadores moleculares. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 3, pág. 581-587, 2022.
- STROMMER, J. The plant ADH gene family. **The Plant Journal** 66.1 (2011): 128-142.
- SÜDÜPAK, Mehmet Ali. SSR-based genetic diversity assessment of Turkish Chickpea varieties. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 27, n. 5, p. 4087-4090, 2013.
- SUJUN, L. *et al.* Fine mapping of CaMYB113 regulating anthocyanin accumulation in pepper cotyledons. **Research Square**, 2023.

SUNDARAM, P. *et al.* Inheritance and relationships of flowering time and seed size in kabuli chickpea. **Euphytica**, v. 215, p. 1-14, 2019.

TAIZ, L., ZEIGER, E. (2017). **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora.

TALEBI, R. *et al.* Geographical patterns of genetic diversity in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) characterized by amplified fragment length polymorphism. **Plant Soil Environ**, 54(10), 447-452. 2008.

TAN, X. *et al.* Estimation of leaf color variances of *Cotinus coggygia* based on geographic and environmental variables. **Journal of Forestry Research**, v. 32, n. 2, p. 609-622, 2021.

TESNIERE, C.; VERRIES, C. **Alcohol dehydrogenase: a molecular marker in grapevine. In: Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2001. p. 203-223.

THAKUR, S. *et al.* Confirmation of hybridity using DNA-based markers is essential in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **The Pharma Innovation Journal**, v.10 n.12 p. 3022-3025, 2021.

TSUBOKURA, Y. *et al.* Genetic variation in soybean at the maturity locus E4 is involved in adaptation to long days at high latitudes. **Agronomy**, v. 3, n. 1, p. 117-134, 2013.

TSUTSUMIDA, N. *et al.* Evaluation of land surface phenology for autumn leaf color change based on citizen reports across Japan. **Remote Sensing**, v. 14, n. 9, p. 2017, 2022.

UDUPA, S. M. *et al.* Narrow genetic variability in *Cicer arietinum* L. as revealed by RFLP analysis. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 83-86, 1993.

UPADHYAYA, H. D. *et al.* Two major genes for seed size in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Euphytica**, v. 147, p. 311-315, 2006.

UPADHYAYA, H. D. Geographical patterns of variation for morphological and agronomic characteristics in the chickpea germplasm collection. **Euphytica**, v. 132, p. 343-352, 2003.

VALADEZ-MOCTEZUMA, E. *et al.* Genetic variability and population structure of Mexican chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm accessions revealed by microsatellite markers. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 29, p. 357-367, 2020.

VAN RHEENEN, H.A. *et al.* How to accelerate the genetic improvement of a recalcitrant crop species such as chickpea. **Current Science**, v. 65, p. 414-17, 1993.

VARSHNEY R. K. *et al.* Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum* L.) provides a resource for trait improvement. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 240-246. 2013.

VICENTE M. C. *et al.* Genetic characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. **The Role of Biotechnology**, v. 5, n. 7, 2005.

VIEIRA, E. S. N. *et al.* Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p.

86-94, 2009.

VIOQUE, J. *et al.* Comparative study of chickpea and pea PA2 albumins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3609-3613, 1998.

VON PINHO, E. V. R. *et al.* Utilização de características morfológicas para avaliação da pureza genética em sementes híbridas de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 941-949, 1997.

VURAL, H. C.; AKCIN, A. Molecular analysis of chickpea species through molecular markers. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, n. 2, p. 1828-1832, 2010.

WAKASA, Y.; TAKAIWA, F. The use of rice seeds to produce human pharmaceuticals for oral therapy. **Biotechnology journal**, v. 8, n. 10, p. 1133-1143, 2013.

WEEDEN, N. F.; WENDEL, J. F. **Genetics of plant isozymes**. In: SOLTIS D.E., SOLTIS P.S. (Ed). *Isozymes in plant biology*. London: Chapman and Hall, 1990. p.46-72.

WINTER P. *et al.* A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* × *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5. **Theoretical and Applied Genetics** 101, 1155–1163. 2000.

WOOD, J. A. *et al.* Differences between easy-and difficult-to-mill chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. Part I: Broad chemical composition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 7, p. 1437-1445, 2014.

WOOD, J. A. *et al.* Morphology of chickpea seeds (*Cicer arietinum*L.): comparison of desi and kabuli types. **International Journal of Plant Sciences**, v. 172, n. 5, p. 632-643. 2011.

YADAV, G. *et al.* Identification and characterization of chickpea genotypes for early flowering and higher seed germination through molecular markers. **Molecular Biology Reports**, 1-8. 2022.

YADAV, R. *et al.* Cross priming with drought improves heat-tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) by stimulating small heat shock proteins and antioxidative defense. **Environmental Sustainability**, v. 4, n. 1, p. 171-182, 2021.

YIN, X. Analysis of reciprocal-transfer experiments to estimate the length of phases having different responses to temperature. **Annals of botany**, v. 101, n. 4, p. 603-611, 2008.

YUDINA, R. S. Malate dehydrogenase in plants: Its genetics, structure, localization and use as a marker. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, n. 04, p. 370-377, 2012.

YILDIRIM, M. *et al.* Analyses of genetic diversity and population structure of endemic and endangered species *Sideritis gulendamii* (Lamiaceae) and implications for its conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, p. 1-15, 2024.

ZHANG, J. *et al.* Functions of alcohol dehydrogenase family in abiotic stress responses in plants. **Chinese Agricultural Science Bulletin**, v. 31, p. 246-250, 2015.

ZHANG, J. *et al.* Identification and characterization of two waterlogging responsive alcohol dehydrogenase genes (AdADH1 and AdADH2) in *Actinidia deliciosa*. **Molecular breeding**, v. 37, p. 1-13, 2017.