



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE  
PROGÊNIES DE *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung**

**ISA MAYARA RIBEIRO DO NASCIMENTO**

**2018**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**ISA MAYARA RIBEIRO DO NASCIMENTO**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE PROGÊNIES DE  
*Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientadora  
Dra. Ana Veruska Cruz da Silva

Coorientador  
Dr. José Henrique de Albuquerque Rangel

SÃO CRISTÓVÃO  
SERGIPE – BRASIL  
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

N244c Nascimento, Isa Mayara Ribeiro do.  
Caracterização morfológica e molecular de progênies de  
*Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung / Isa Mayara Ribeiro do  
Nascimento; orientadora Ana Veruska Cruz da Silva. – São  
Cristóvão, 2018.  
36 f.: il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade)–  
Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Plantas forrageiras. 2. Plantas - Conservação. 3.  
Leguminosa. 4. Diversidade biológica. I. Silva, Ana Veruska Cruz  
da, orient. II. Título.

CDU 636.085.51

**ISA MAYARA RIBEIRO DO NASCIMENTO**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE PROGÊNIES DE  
*Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 27 de julho de 2018.

Dra. Priscilla Santana Santos  
Faculdade do Nordeste da Bahia – Faneb

Prof. Dr. Evandro Neves Muniz  
Embrapa Tabuleiros Costeiros

Dra. Ana Veruska Cruz da Silva  
Embrapa Tabuleiros Costeiros/Universidade Federal de Sergipe  
(Orientadora)

**SÃO CRISTÓVÃO  
SERGIPE – BRASIL**

A Deus, aos meus pais, Denise M. R. do Nascimento e Antônio C. do Nascimento  
e a toda família.  
*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força, garra e perseverança para concluir mais essa etapa da minha vida. Tudo posso naquele que me fortalece.

Aos meus pais Denise e Antônio Carlos, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões, por me guiarem no caminho certo e por acreditarem em mim, mesmo quando não achei que era possível.

A toda a minha família, primos, primas, tios e tias, em especial a minha avó Lora, avô Chico e a minha avó Maria. Obrigada por torcerem por mim.

Ao meu namorado Vítor, por sempre estar ao meu lado e ser minha calma nos momentos de desespero, e a toda sua família, em especial a minha sogra tia Ninha, pelos sábios conselhos.

À minha orientadora Dra. Ana Veruska, que se tornou uma mãe para mim nesses últimos dois anos de mestrado. Obrigada pelo apoio em todos os meus projetos de vida, por me compreender e sonhar junto comigo. A Dr. Evandro e às meninas Marcela e Aninha, vocês são uma família maravilhosa.

A Dr. Rangel, por estar sempre acreditando no meu potencial e me passando tanto conhecimento durante todos esses anos de orientação como bolsista, e agora com o mestrado.

Ao técnico Silvio Gomes, por ter sido tão atencioso e por ter me ensinado com tanta paciência, não teria conseguido sem você. Obrigada pelos conselhos.

A Milena, Adrielle e Leti, muito obrigada por toda ajuda, vocês foram cruciais nesse período.

Ao Dr. Rafael Dantas e Dra. Camila Almeida, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Ao técnico Railton e aos meninos Erick, Acir e Cosme, muito obrigada pelos dias de campo com muita diversão e por toda ajuda.

À Universidade Federal de Sergipe (UFS) e em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI) pela oportunidade.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros por todo suporte para a realização dos meus trabalhos e pesquisas.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A todo pessoal do LABMOL e do LABCULT, Renata, Kesia, Dani, Fernanda, Leila, Cinthia, Anne, Carol, Tati, Alex, Carlos, pelos momentos de trabalho e descontração.

Quero agradecer a todos que de certa forma contribuíram para a realização e fizeram parte desta conquista.

## **BIOGRAFIA**

ISA MAYARA RIBEIRO DO NASCIMENTO (NASCIMENTO, I. M. R.), filha de Denise Maria Ribeiro do Nascimento e Antônio Carlos do Nascimento, nasceu em Aracaju, estado de Sergipe, em 02 de dezembro de 1989.

Em 2009, iniciou o curso de Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Sergipe – UFS, graduando-se em 2015.

Em agosto de 2016, ingressou no curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade pela Universidade Federal de Sergipe, atuando na área de recursos genéticos e propagação vegetal.

Desenvolveu a dissertação no Laboratório de Biologia Molecular e no Campo Experimental Jorge do Prado Sobral em Nossa Senhora das Dores, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Sergipe, Brasil.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	iii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1 <i>Desmanthus</i> spp. ....	2
2.2 Conservação dos recursos genéticos.....	3
2.3 Caracterização morfológica e molecular .....	3
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	5
4. ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE PROGÊNIES DE <i>Desmanthus pernambucanus</i> (L.) Thellung. ....	8
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1 Introdução .....	9
4.2 Material e Métodos .....	10
4.3 Resultados e Discussão.....	14
4.4 Conclusões.....	21
4.5 Referências Bibliográficas.....	21

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Beneficiamento das sementes de <i>Desmanthus pernambucanus</i> (L.) Thellung.....	10
2	Processo de germinação de sementes de <i>Desmanthus pernambucanus</i> (L.) Thellung em caixas <i>gerbox</i> , forradas com papel <i>germitest</i> e mantidas em câmara BOD.....	11
3	Localização do Campo Experimental Jorge do Prado Sobral, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Nossa Senhora das Dores, Sergipe, Brasil.....	11
4	Implantação do experimento no Campo Experimental Jorge do Prado Sobral - Embrapa Tabuleiros Costeiros, no município de Nossa Senhora das Dores, Sergipe.....	12
5	Dendrograma de similaridade entre 15 acessos de <i>Desmanthus pernambucanus</i> (L.) Thellung.....	15
6	Gráfico de distribuição dos acessos com relação aos componentes principais.....	16
7	Gráfico de vetores dos componentes principais.....	16
8	Representação gráfica da correlação entre as variáveis analisadas.....	17
9	Dendrograma obtido pelo método UPGMA com base no índice de similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard (1908) para 15 genótipos de <i>Desmanthus pernambucanus</i> (L.) Thellung.....	20
10	Análise de coordenadas principais (ACoP).....	20
11	Representação dos 15 genótipos de <i>Desmanthus pernambucanus</i> (L.) Thellung em grupos segundo dados moleculares com oito <i>primers</i> ISSRs, utilizando o programa 'Structure' ( $\Delta K=4$ ).....	21

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	<i>Primers</i> ISSR testados em <i>Desmanthus pernambucanus</i> (L.) Thellung, respectivas sequências e temperaturas de anelamento.....	13
2	Relação dos <i>primers</i> ISSR, número total de bandas, porcentagem de polimorfismo e amplitude de bases, gerados pelas reações de PCR para estudo da diversidade genética de acessos de <i>Desmanthus pernambucanus</i> (L.) Thellung.....	17
3	Número de indivíduos, Número de alelos observados ( $N_A$ ), Número de alelos efetivos ( $N_E$ ), Índice de Shannon (I), Heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) e Heterozigosidade observada ( $H_O$ ) para as amostras de <i>Desmanthus pernambucanus</i> (L.) Thellung obtidos por marcadores ISSR.....	18
4	Matriz de similaridade de Jaccard utilizando oito <i>primers</i> pela técnica ISSR entre 15 genótipos de <i>Desmanthus pernambucanus</i> (L.) Thellung.....	19

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BAG	Banco Ativo de Germoplasma
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
RAS	Regras para Análises de Sementes
ES	Espessura de Sementes (mm)
PS	Peso de Sementes (g)
S	Porcentagem de Sobrevivência (%)
ALT	Altura de Plantas (cm)
NF	Número de folhas
<i>Fst</i>	Índice de divergência genética
ISSR	Inter Sequência Simples Repetida
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
A	Número de alelos
n	Número de amostras
R	Riqueza alélica
He	Heterozigosidade esperada
Ho	Heterozigosidade observada
<i>f</i>	Coefficiente de endogamia
FST	Índice de divergência genética
Ta	Temperatura de anelamento
pb	Amplitude alélica
GI	Identidade Genética de Nei
I	Índice de Shannon
TF	Total de Fragmentos
FP	Fragmentos Polimórficos
PPF	Porcentagem de Polimorfismo
s	Similaridade
ACoP	Análise de Coordenadas Principais
AMOVA	Análise de Variância Molecular
UPGMA	Método de grupo de pares com médias aritméticas não ponderadas

**RESUMO**

NASCIMENTO, Isa Mayara Ribeiro. **Caracterização morfológica e molecular de progênies de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung.** São Cristóvão: UFS, 2018. 36p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).\*

O *Desmanthus pernambucanus* tem origem na América do Sul, provavelmente no Nordeste do Brasil. Apesar de apresentar grande potencial como alternativa para alimentação de ruminantes e como banco de proteína, há uma grande carência de estudos sobre o comportamento no sistema produtivo. Já existem muitos trabalhos de conservação, coleções e bancos de germoplasma relacionados às culturas potenciais para o agronegócio, porém não há muitos projetos com as espécies forrageiras, necessitando de um trabalho de pré-melhoramento para serem usadas no desenvolvimento de novas cultivares. O estudo do comportamento morfológico e produtivo dos genótipos de *Desmanthus*, quando cultivados e manejados sob corte, é de grande importância, uma vez que permitirá a seleção de materiais com características desejáveis. A caracterização molecular fornece informações úteis ao melhorista, como a identificação de duplicatas e intercâmbio de germoplasma. Nesse sentido, o desenvolvimento de pesquisas envolvendo a diversidade genética por meio de marcadores moleculares ISSR e de descritores morfológicos desse gênero são importantes para a seleção das melhores plantas e escolha das melhores características da espécie. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de realizar a caracterização morfológica e molecular de progênies de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung para implantação de Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Para a realização do trabalho foram utilizadas sementes para multiplicação e produção das progênies oriundas da coleção de germoplasma do CSIRO, Austrália, e beneficiadas no Laboratório de Sementes da Embrapa Tabuleiros Costeiros. As progênies produzidas foram levadas para o Campo Experimental Jorge do Prado Sobral, Nossa Senhora das Dores, SE, entre maio e julho de 2017. Para a caracterização morfológica foram utilizadas três plantas de cada acesso por bloco utilizando descritores. Para a caracterização molecular usou-se oito marcadores ISSR, coletando-se folhas jovens de três plantas por acesso/bloco. Para a análise morfológica utilizou-se os programas MINITAB Versão 16.2.4.4. e o SAS<sup>®</sup> versão 9.4, e para a molecular foram utilizados os programas Genalex 6.5, NTSYS-pc 2.0 e o Structure Harvester. Os resultados obtidos foram significativos e indicaram destaque para as progênies 249, 268, 239, 247 e 257. Na análise molecular os indivíduos mais distantes geneticamente foram 246, 255, 245, 268, 242. As progênies 249, 268, 239, 247, 257, 246, 255, 245, 242 são materiais indicados para a implantação do BAG.

**Palavras-chave:** Jureminha, conservação *ex situ*, forragem, leguminosa nativa, diversidade genética.

---

\*Comitê orientador: Dra. Ana Veruska Cruz da Silva – Embrapa Tabuleiros Costeiros (Orientadora), Dr. José Henrique de Albuquerque Rangel – Embrapa Tabuleiros Costeiros (Coorientador).

**ABSTRACT**

NASCIMENTO, Isa Mayara Ribeiro. **Morphological and molecular characterization of *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung**. São Cristóvão: UFS, 2018. p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).\*

*Desmanthus pernambucanus* originates from South America, probably in the Northeast of Brazil. Despite the great potential of the species as an alternative for ruminates feeding and protein bank, studies on the behavior in the productive system are still scarce. Several works have addressed the conservation, collections, and germplasm banks regarding potential crops for agribusiness. However, not many projects have focused on forage species; therefore, pre-breeding works are necessary so that these species can be used in the development of new cultivars. The study on the morphological and productive behavior of *Desmanthus* genotypes when cultivated and managed under cutting is fundamental since it allows the selection of materials with desirable traits. Molecular characterization provides useful information to the breeder, such as duplicates identification and germplasm exchange. Thus, research involving the genetic diversity of this genus by ISSR molecular markers and morphological descriptors is important for the selection of the best plants and the choice of the best traits of the species. The present work aimed to perform the morphological and molecular characterization of *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung progenies for the implantation of an Active Germplasm Bank at Embrapa Coastal Tablelands. Therefore, seeds from the CSIRO Germplasm Bank, Australia, were used for multiplication and production of progenies and benefited at the Seed Laboratory of Embrapa Coastal Tablelands. The generated progenies were taken to the Experimental Field Jorge do Prado Sobral, in Nossa Senhora das Dores, SE, between May and July 2017. The morphological characterization was performed with three plants of each accession per block, using some descriptors. The molecular characterization was carried out with eight ISSR markers, using young leaves from three plants per accession/block. The morphological analysis was conducted in the software MINITAB, version 16.2.4.4 and SAS<sup>®</sup>, version 9.4. The molecular analysis used the software Genalex 6.5, NTSYS-pc 2.0, and Structure Harvester. Results obtained were significant and highlighted progenies 249, 268, 239, 247, and 257. In the molecular analysis, the most genetically distant individuals were 246, 255, 245, 268, and 242. Progenies 249, 268, 239, 247, 257, 246, 255, 245, and 242 are recommended for the implantation of the germplasm bank.

**Keywords:** Jureminha, *ex situ* conservation, forage, native legumes, genetic diversity

---

\*Advisor committee: Dra. Ana Veruska Cruz da Silva – Embrapa Tabuleiros Costeiros (Orientadora); Dr. José Henrique de Albuquerque Rangel – Embrapa Tabuleiros Costeiros (Coorientador).

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Na região do Semiárido nordestino, o aproveitamento das leguminosas destina-se, em sua maioria, à alimentação dos animais ruminantes, onde busca-se constantemente formular dietas eficientes e de baixo custo, o que aumenta a necessidade de pesquisas para determinação da composição química e da digestibilidade dos nutrientes dos alimentos utilizados nas formulações, visando obter maior eficiência no desempenho animal (NUNES et al., 2005).

Leguminosas tropicais são plantas que possuem ampla distribuição geográfica e são encontradas em diversos lugares com diferentes tipos de solos e clima. São espécies com grandes quantitativos de riqueza em diversidade taxonômica, sendo considerada a terceira maior família em números de espécies (FONTENELE, 2009).

O Brasil é um centro de diversificação e distribuição de leguminosas forrageiras, porém este enorme potencial continua ainda sendo pouco utilizado no setor agropecuário pela falta de conhecimento das espécies. Os programas de pastagens consorciadas com enfoque sobre as leguminosas nativas ainda são insuficientes, além do que, entre estas, apenas algumas espécies herbáceas e subarbustivas têm recebido maiores atenções dos pesquisadores e melhoristas nos seus programas de pastagens (ARAGÃO; MARTINS, 1996).

A busca por produção autossustentável tem aumentado em nível mundial, intensificando cada vez mais o interesse por recursos genéticos nativos e o gênero *Desmanthus* tem sido avaliado como de grande potencialidade para pastagens, pois é uma planta que resiste a períodos de secas, que tem alta capacidade de rebrota e produz muita semente (GARDINER; BURT, 1995).

A maioria dos gêneros *Demanthus* se encontra inexplorada, faltando informações sobre os limites ecológicos, geográficos ou mesmo taxonômicos, do conjunto de genes disponíveis dessas espécies. Para o produtor, o manejo inadequado e a falta de persistência podem ser determinantes para o sucesso na produção dessas espécies (BARCELLOS; VILELLA, 1994). O *Desmanthus pernambucanus* é uma planta de ocorrência natural do Nordeste brasileiro, sendo assim, é importante que sejam feitos estudos com essa espécie visando beneficiar a comunidade local.

O trabalho tem como objetivo realizar a caracterização morfológica e molecular de progênies de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Desmanthus* spp.

O gênero *Desmanthus* apresenta ampla distribuição ecogeográfica, podendo ser encontrado desde os EUA, Texas (oito espécies) e México, onde apresentam maior diversidade (14 espécies), até em países da América do Sul como Argentina, Brasil, Peru (BURT, 1987; VAVILOV, 1992).

O *Desmanthus* spp. apresenta complexa taxonomia. Vários autores relatam as dificuldades para classificar taxonomicamente o gênero (BURT, 1987), possui 24 espécies pertencentes à subfamília Mimosoideae (LUCKOW, 1993). As plantas apresentam ramos alongados e finos, folhas bipinadas, folíolos oblongos, frutos do tipo vagem estreita, hastes finas, inflorescência axilar, raízes duras e armazenadoras de água e nutrientes (QUEIROZ, 2009; ALCÂNTARA; BUFARAH, 2004).

As espécies desse gênero são persistentes sob superpastejo em solos argilosos em seus ambientes nativos, uma característica pouco encontrada em leguminosas, sendo indicadas para o cultivo nesse tipo de solo (PENNELLY; CONWAY, 2000). São plantas palatáveis, com alta produtividade (ZABALA et al., 2008), tolerantes à seca e com alta produção de sementes, destacando esse como um componente-chave para persistência de plantas (QUEIROZ, 2016).

Por apresentar alta rusticidade e agressividade, a leguminosa é uma forrageira que pode ser utilizada em melhoramento de pastagens, recuperação de áreas degradadas, cobertura de solo, como espécies primárias e formações sucessionais (SOUZA, 2005). Apresentam rápida propagação e conseguem se adaptar em diversos ambientes, desde regiões quentes até em locais com altas umidades (SKERMAN et al., 1991).

No Brasil, se desenvolvem nas regiões Sul, Suldeste e Nordeste e são encontradas cinco espécies nativas do gênero, *Desmanthus leptophyllus* Kunt, *Desmanthus paspalacus* (Lindm), *Desmanthus tatuhyensis*, *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thelung e *Desmanthus virgatus* (L.) Wild, sendo as duas últimas espécies mais recorrentes no Nordeste brasileiro, principalmente em Pernambuco, Maranhão, Bahia e Paraíba (LIMA; MELO, 2015). O *Desmanthus pernambucanus* pode ser encontrado também em alguns municípios do Semiárido sergipano.

Segundo Pengelly e Liu (2001), dentre as espécies do gênero, *Desmanthus pernambucanus* tem origem na América do Sul, provavelmente no Nordeste do Brasil. É uma planta que apresenta flores amarelas, com folhas bipinadas e raízes penetrantes, resistentes e duras e com elevada produção de sementes (ALCÂNTARA; BUFARAH, 2004), podem variar de eretas a prostadas e são bastante influenciadas pelo local de ocorrência (FONTENELE et al., 2009). São plantas autogamas e sua propagação é via semente (SANTOS et al., 2012).

Em alguns lugares o *Desmanthus* é considerado fonte suplementar de proteína para os animais ruminantes, utilizando as folhas frescas da espécie (SUKKASAME; PHAIKAEW, 2011). São indicadas também para alimentação de coelhos brancos, proporcionando melhor taxa de conversão alimentar com menor custo de produção por kg de peso corporal (GUNASEKARAN et al., 2013).

Rangel e Gardiner (2009) dizem que o *Desmanthus* pode ser usado como benefício financeiro em áreas com chuvas irregulares e como suplemento na alimentação de ovelhas na forma de feno, reduzindo a perda de peso e maior crescimento de lã dos ovinos.

As primeiras introduções de *Desmanthus* em coleções de germoplasma ocorreram há mais de 50 anos, entretanto, somente nos últimos 20 anos tem sido pesquisada como espécie com potencial econômico (SOUZA, 2005). Apesar do *Desmanthus* spp. apresentar grande

potencial como alternativa para alimentação de ruminantes, como banco de proteína, há uma grande carência de estudos sobre o comportamento no sistema produtivo, para que se possa disponibilizar ao produtor rural (FONTENELE et al., 2009).

## **2.2 Conservação dos recursos genéticos**

São considerados Recursos Genéticos Vegetais (RGVs) a vegetação nativa dos diversos biomas, bem como a agrobiodiversidade, que ensejam recursos de grande interesse econômico, tanto para uso atual quanto para uso potencial (MMA, 2000). No início do século XX, o botânico russo Nikolai Vavilov foi o pioneiro nos trabalhos com RGVs, e a partir desse trabalho esses recursos têm sido objeto de grande interesse no mundo e no Brasil (OLIVEIRA, 2015).

Após a Segunda Guerra Mundial, a conscientização relacionada ao perigo de erosão genética começou a se desenvolver e a partir de 1947 houve um maior interesse por parte da FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura) nos recursos genéticos vegetais (NASS et al., 2001; NASS, 2007). Atualmente são conservados cerca de 6,1 milhões de acessos de plantas, alguns desses encontram-se em bancos de germoplasma distribuídos pelos 157 países que compõem a Comissão de Recursos Fitogenéticos da FAO (FAO, 2009).

A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Recursos Genéticos e Biotecnologia gerencia uma rede concentrada em atividades de conservação e uso sustentável da diversidade genética, com ênfase no enriquecimento, caracterização, valoração e documentação, tanto de recursos genéticos vegetais, como de animais e microrganismos (LOPES; MELLO, 2004).

Apesar do Brasil ser o país detentor da maior biodiversidade mundial, apresenta em termos de agricultura uma deficiência de germoplasma exótico, pois, em sua maioria, se baseia no uso de espécies como a soja, milho, batata, cana-de-açúcar, citros. Essas culturas alavancam o negócio agrícola brasileiro e, por conseguinte, foram os germoplasmas mais trabalhados do ponto de vista de melhoramento e conservação genética (MORALLES; VALOIS, 2000).

Apesar de já existirem muitos trabalhos de conservação, coleções e bancos de germoplasma relacionados às culturas potenciais para o agronegócio, não existem muitos projetos com as espécies forrageiras, frutíferas e ornamentais, necessitando de um trabalho de pré-melhoramento para serem usadas no desenvolvimento de novas cultivares (OLIVEIRA, 2015).

Alguns Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) já são encontrados no Nordeste do Brasil, com diferentes tipos de frutíferas tropicais, olerícolas, forrageiras, grãos, fibrosas e oleaginosas, no entanto existe a necessidade de ampliar as coletas desses materiais, bem como a caracterização e a avaliação dos germoplasmas, resgatar a variabilidade genética de espécies nativas que apresentam potencial e aprofundar os estudos sistematizados sobre o manejo dos recursos genéticos com espécies existentes na região (OLIVEIRA, 2015).

A conservação requer apoio institucional, ou seja, gerir de maneira sustentável os recursos econômicos, humanos e técnicos necessários para manter as coleções e realizar as atividades de conservação (IPGRI, 2000).

## **2.3 Caracterização morfológica e molecular**

A caracterização morfológica possibilita a descrição da divergência entre genótipos, bem como definir os mais promissores e identificar os caracteres que ajudam na separação dos genótipos (MARTUSCELLO et al., 2015). Para conhecer algumas características e determinar a sua utilidade, foram usados os descritores que são específicos para cada espécie, podendo ser utilizados para diferenciar genótipos e expressar atributos de forma precisa e uniforme. Existem vários caracteres que podem ser identificados em uma espécie, porém, os caracteres realmente úteis são aqueles que podem ser visualizados a olho nu, de fácil registro,

com alta taxa de hereditariedade, alto valor taxonômico e agrônômico, e que permitem diferenciar um acesso de outro (SANTOS; BITTENCOURT, 2001).

Para que se torne possível a exploração de potencial de produção e crescimento desta planta forrageira, é necessário conhecer as características morfológicas, pois essas fornecem informações detalhadas de crescimento vegetal (GOMIDE et al., 2006). O estudo do comportamento morfológico e produtivo dos genótipos de *Desmanthus*, quando cultivados e manejados sob corte, é de grande importância, uma vez que permitirá a seleção de materiais com características desejáveis para plantas forrageiras como boa capacidade de rebrotação, persistência, maior relação folha/colmo e maior rendimento de forragem (CALADO et al., 2016).

Plantas de gênero *Desmanthus* apresentam variabilidade genética, o que possibilita a mesma se adaptar às mudanças ambientais (DAUFRESNE; RENAULT, 2006).

Ainda são recentes as pesquisas de diversidade genética com a espécie, e para iniciar um programa de melhoramento é fundamental conhecer a diversidade genética que existe (MELO et al., 2011). A caracterização molecular fornece informações úteis ao melhorista, como a identificação de duplicatas e intercâmbio de germoplasma (MARTINS et al., 2012).

No gênero *Desmanthus* encontra-se um grande polimorfismo intra e interespecífico, sendo um fator importante na busca de acessos para a alta produção de forragens e possibilitando adaptação às mudanças ambientais (LUCKOW, 1993; GARDINER; BURT, 1995; DAUFRESNE; RENAULT, 2006).

Segundo Faleiro (2007), a utilização de marcadores moleculares, sequências de DNA que revelam polimorfismos entre indivíduos com genética similares, passam a ser essenciais para complementar as informações ecológicas e morfológicas dos recursos genéticos, contribuindo para aumentar a eficiência dos processos de coleta, enriquecer a base genética, analisar a diversidade e a pureza genética, identificar acessos semelhantes, subsidiar a seleção de genitores, o planejamento dos cruzamentos e a seleção de genótipos com características desejadas em programas de melhoramento genético.

Avaliando cinco acessos do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), instalado no município de Serra Talhada – PE por marcadores AFLP, Queiroz (2016) obteve alto polimorfismo e constatou que a distância geográfica não influenciou a distância genética, pois acessos geograficamente próximos e da mesma espécie não apresentaram semelhanças genéticas e, ao contrário, acessos distantes geograficamente e de espécies diferentes apresentaram.

Utilizando oito marcadores ISSR, Costa et al. (2017) avaliaram 26 acessos do BAG da UFRPE e indicaram oito acessos para serem utilizados em programas de melhoramento genético.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, P. B.; BUFARAH, G. **Plantas forrageiras: gramíneas e leguminosas**. Editora Nobel, São Paulo, 2004. p. 150.

ARAGÃO, W.M.; MARTINS, P.S. **Jureminha (*Desmanthus virgatus* L.): uma leguminosa forrageira promissora**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1996. 40p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 5).

BARCELLOS, A.O.; VILELLA, L. Leguminosas forrageiras tropicais: estado da arte e perspectivas futuras. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FORRAGICULTURA, 31. 1994, Maringá. **Anais...** Maringá: EDUEM, 1994, p.1-56.

BURT, R. L. Alternative legumes to *Stylosanthes*. Annual Report CSIRO 1986-87, **Brisbane**, p. 15-17, 1987.

CALADO, T. B.; CUNHA, M. V.; TEIXEIRA, V.I.; SANTOS, M.V.F.; CAVALCANTI, H.S.; LIRA, C.C. Morphology and productivity of “Jureminha” genotypes (*Desmanthus* spp.) Under different cutting intensities. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 3, p. 742-752, 2016.

COSTA, J.C.; FRACETTO, G.G.M.; SANTOS, M.V.F.; LIRA JÚNIOR, M.A. Genetic diversity of *Desmanthus* sp. accessions using ISSR markers and morphological traits. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1-9, 2017.

DAUFRESNE, M.; RENAULT, O. Population fluctuations, regulation and limitation in stream-living brown trout. **Oikos**, v. 113, p. 335-459, 2006.

FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of Brazil’s plant genetic resources: Second National Report: Conservation and sustainable utilization for food and agriculture**. Brasília – DF. Informação Tecnológica da Embrapa. 1 ed., 236p. 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/Brazil.pdf> (Acesso em 1º de junho de 2018).

FONTENELE, A.C.F.; ARAGÃO, W.A.; RANGEL, J. H. H.; ALMEIDA, A.S. Leguminosas tropicais: *Desmanthus virgatus* (L.) Wild. Uma forrageira promissora. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 18, p. 121-123, 2009.

GARDINER, C.P.; BURT, R.L. Performance characteristics of *Desmanthus virgatus* in: contrasting tropical environments. **Tropical Grasslands**, Austrália, v. 29, p. 183-187, 1995.

GOMIDE, C.A.M.; GOMIDE, J.A.; PACIULLIO, D.S.C. Morfogênese como ferramenta para o manejo de pastagens. In: **Anais de Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 43. João Pessoa. p.554, 2006.

GUNASEKARAN, S.; VISWANATHAN, K.; PASUPATHY, K.; RADHAKRISHNAN, L. Evaluation of Leguminous Fodders for Growth Performance in Weaned New Zealand White Rabbits. **International Journal Applied Science and Engineering**, v. 1, n. 1, p. 10-12, 2013.

IPGRI - Instituto Internacional para os Recursos Fitogenéticos. **Manual de apoio à formação e treino em Conservação ex situ de Recursos Fitogenéticos**. Cali, Colômbia, 211p. 2000.

LIMA, E.A.; MELO, J.I.M. Biological spectrum and dispersal syndromes in an area of semi-arid region of north-eastern Brazil. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v. 37, p. 91-100, 2015.

LOPES, M. A. e MELLO, S. C. M. **Estratégias para Melhoria, Manutenção e Dinamização do Uso dos Bancos de Germoplasma Relevantes para a Agricultura Brasileira**. Centro de Gestão e estudos Estratégicos. Brasília, 2004.

LUCKOW, M. *Desmanthus* (Leguminosae-Mimosoideae), 166f. Monograph. Austrália, v.38, 1993.

MARTINS, G.V.; MARTINS, L.S.S.; VEASEY, E.A.; LEDERMAN, I.E.; SILVA, E.F. Diversity and genetic structure in natural populations of *Hancornia speciosa* var. *speciosa* Gomes in northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, p. 1143-1153, 2012.

MARTUSCELLO, J. A.; BRAZ, T. G. S.; JANK, L.; CUNHA, D. N. F. V.; LIMA, B. P. S.; OLIVEIRA, L. P. Repeatability and phenotypic stabilization of *Panicum maximum* accessions. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 37, p. 15-21, 2015.

MELO, R.A.; RESENDE, L.V.; MENEZES, D.; BECK, A.P.A.; COSTA, J.C.; COUTINHO, A.E.; NASCIMENTO, A.V.S. Genetic similarity between coriander genotypes using ISSR markers. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 526-530, 2011.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. **A Convenção Sobre a Diversidade Biológica – CDB**. Centro de informação e Documentação Luís Eduardo Magalhães - CID Ambiental. 2000.

MORALLES, E.A.V.; VALOIS, A.C.C. Recursos Genéticos Vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 11-42, 2000.

NASS, L.L. (Org.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 1, 858p. 2007.

NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C; MELO, I.S.; VALADARES-ILGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. In: NASS, L. L. Utilização dos Recursos Genéticos Vegetais no Melhoramento. Rondonópolis, Fundação MT. 1183p. 2001.

NUNES, R.V.; POZZA, P.C.; NUNES, C.G.V.; CAMPESTRINI, E. Valores energéticos de subprodutos de origem animal para aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1217-1224, 2005.

OLIVEIRA, R. S. **Coleta, caracterização e avaliação preliminar de acessos de Stylosanthes spp.** 2015. 112 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos) - Universidade Estadual de Feira de Santana, 2015.

PENGELLY, B. C.; LIU, C.J. Genetic relationships and variation in the tropical mimosoid legume *Desmanthus* assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 48, n. 1, p. 91-99, 2001.

PENGELLY, B.C.; CONWAY, M.J. Pastures on cropping soils: which tropical pasture legume to use? **Tropical Grasslands**, v. 34, p. 162-168, 2000.

QUEIROZ, I.V. **Variabilidade genética e caracterização morfológica, produtiva e qualitativa de *Desmanthus* spp.** 2016. 167 f. Tese (Doutorado integrado em Zootecnia) - UFRPE/UFPB/UFC, 2016.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da caatinga**, Editora da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 467 p. 2009.

RANGEL, J.H.A; GARDINER, C.P. Stimulation of wool growth by *Desmanthus* spp. as a supplement to a diet of Mitchell grass hay. **Tropical Grasslands**, v. 43, p. 106-111, 2009.

SANTOS, E.C.X.R.; CARVALHO, R.; ALMEIDA, E. M.; FELIX, L. P. Chromosome number variation and evolution in Neotropical Leguminosae from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n.3, p. 2451-2475, 2012.

SANTOS, E; BITTENCOURT, E. **Manual de apoio à formação e treino em conservação ex situ de recursos fitogenéticos**. Instituto Nacional de Investigação Agrária (INIA), Nalrobi, Quênia. 2001.

SKERMAN, P.J; CAMERON, D.G; RIVEROS, F. **Leguminosas forrageiras tropicales**. Roma: FAO, 707p. 1991.

SOUZA, V.C. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: **Instituto plantarum**, 329p. 2005.

SUKKASAME, P.; PHAIKAEW, C. Utilization of *Desmanthus virgatus* as protein supplement for fattening cattle in southern Thailand. **Integrated Crop-Livestock production systems and fodder trees**. p. 157-159, 2011.

VAVILOV, N.I. Origin and Geography of Cultivated Plants. **Cambridge University Press**, Cambridge. 1992.

ZABALA, J.M.; PENSIERO, J.F.; TOMAS, P.A.; GIAVEDONI, J.A. Morphological characterisation of populations of *Desmanthus virgatus* complex from Argentina. **Tropical Grassland**, v. 42, p. 229-236, 2008.

**4. ARTIGO 1**  
**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE PROGÊNIES DE**  
***Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung.**

**Periódico a ser submetido:** Genetics and Molecular Research

**RESUMO**

O *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung, popularmente conhecido como Jureminha, é uma leguminosa nativa do Nordeste brasileiro que se destaca pelo elevado teor de proteína, resistência à seca e por não apresentar toxicidade aos animais. O trabalho foi desenvolvido com o objetivo de realizar a caracterização morfológica e molecular de progênies para futura implantação de um banco de germoplasma. As sementes foram oriundas do CSIRO, Austrália e beneficiadas no Laboratório de Sementes da Embrapa Tabuleiros Costeiros. As progênies produzidas foram levadas ao Campo Experimental Jorge do Prado Sobral, no município de Nossa Senhora das Dores, Sergipe, no período de maio a julho de 2017. Avaliou-se 15 acessos utilizando quinze descritores morfológicos e oito marcadores moleculares ISSR. Os marcadores ISSR utilizados foram eficazes para o estudo da diversidade genética de *Desmanthus*, demonstrando intermediária diversidade entre as progênies. Pelo uso dos descritores morfológicos e moleculares utilizados, as progênies 239, 242, 245, 246, 247, 249, 255, 257, 268, são as mais divergentes e indicadas para a implantação do BAG.

**Palavras-chave:** Jureminha, conservação *ex situ*, forragem, leguminosa nativa, diversidade genética.

## ABSTRACT

### Morphological and molecular characterization of *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung

*Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung, popularly known as Jureminha, is a legume native to the Brazilian Northeast, which stands out for its high protein content, resistance to drought and no toxicity to animals. The work was developed with the objective of performing the morphological and molecular characterization of progenies for future implantation of a Genebank. The seeds were sourced from CSIRO, Australia and benefited at the Seed Laboratory of Embrapa Coastal Tablelands. The progenies produced were taken to the Jorge do Prado Sobral Experimental Field, in the municipality of Nossa Senhora das Dores, Sergipe, from May to July 2017. Fifteen accessions were evaluated using 15 morphological descriptors and eight molecular markers ISSR. The ISSR markers used were effective for the study of the genetic diversity of *Desmanthus*, demonstrating intermediate diversity among the progenies. Progenies 239, 242, 245, 246, 247, 249, 255, 257, 268 are the most divergent and indicated for the implantation of the Genebank, using the morphological and molecular descriptors used.

**Key-words:** *Hancornia speciosa* Gomes, conservation, *ex situ*, forage, native legume, genetic diversity.

#### 4.1. Introdução

No Semiárido brasileiro a principal fonte de alimento dos animais é a vegetação nativa, podendo compor a maior porção da dieta dos ruminantes. As plantas leguminosas formam um dos principais recursos naturais da flora nativa e são importantes fontes de alimento para o gado, evidenciando o interesse em se avaliar as forrageiras.

Dentro da família Fabaceae (Leguminosae) existem diversos gêneros, dentre elas o *Desmanthus spp.* sendo considerado por autores como plantas altamente palatáveis, nutritivas e produtivas, e leguminosas persistentes sob superpastejo, podendo ser produzidas em solos argilosos (PENGELLY; CONWAY, 2000).

O *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung, popularmente conhecido como Jureminha, está entre as leguminosas nativas e ganha destaque por vários motivos, dentre eles, seu elevado teor de proteína, persistência no período seco, capacidade de rebrota, agressividade na colonização e alta produção de sementes (CALDAS *et al.*, 2006). Não apresenta toxicidade para os animais e contém bom valor nutricional, além de ser uma planta de ocorrência natural no estado de Sergipe (COSTA *et al.*, 2017).

A diversidade genética é de grande importância para a seleção dos melhores indivíduos de uma espécie, pois, quando adequadamente explorada, pode reduzir a vulnerabilidade da cultura a doenças e, ao mesmo tempo, acelerar o progresso genético para determinados caracteres (CUI *et al.*, 2001).

Existem diferentes formas de avaliar a diversidade genética e similaridades entre plantas de uma mesma família e/ou espécie, sendo que as principais e mais utilizadas atualmente são a caracterização molecular e a caracterização morfológica. Dessa forma, a determinação da dissimilaridade genética, por meio da avaliação simultânea de vários caracteres, através de descritores morfológicos e moleculares, podem ser ferramentas eficientes para a identificação de genótipos superiores, possibilitando a concentração de esforços nas combinações mais promissoras (MOURA *et al.*, 1999).

Entre os diferentes marcadores moleculares, o ISSR é amplamente utilizado para avaliação da diversidade genética de plantas. São marcadores baseados na amplificação de regiões do DNA através da reação em cadeia polimerase (PCR) (FERREIRA *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011). Ele vem se mostrando uma importante ferramenta para análise da diversidade genética, assim como para a caracterização de acessos e cultivares de diversas espécies (ISSHIKI *et al.*, 2008).

Por possuir alta aceitabilidade, elevada taxa de crescimento e tolerância ao corte e pastejo, o gênero *Desmanthus* pode ser uma alternativa com grande potencial para o Nordeste brasileiro. Nesse sentido, o desenvolvimento de pesquisas envolvendo a diversidade genética por meio de marcadores moleculares ISSR e descritores morfológicos desse gênero são importantes para a seleção das melhores plantas e escolha das melhores características da espécie.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de realizar a caracterização morfológica e molecular de progênies de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung provenientes de Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

## 4.2. Material e Métodos

### 4.2.1. Material vegetal

As sementes utilizadas para multiplicação e produção das progênies foram oriundas do Banco de Germoplasma do *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation* (CSIRO) *Tropical Plant and Pastures*, localizado em Camberra, Austrália.

As sementes foram beneficiadas no Laboratório de Sementes da Embrapa Tabuleiros Costeiros, submetidas a um tratamento de assepsia com 12,5 mL de água sanitária diluída em 500 mL de água destilada. Após a quebra de dormência, foram imersas em água destilada com temperatura a 80°C, por um período de 3 minutos, depois retiradas e secas em temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ) (Figura 1).



Figura 1. Beneficiamento das sementes de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung.

As sementes de cada acesso foram colocadas separadamente em caixas *gerbox*, forradas com papel *germitest* previamente esterilizado. As caixas foram umedecidas com água destilada e mantidas em câmara de Germinação BOD com fotoperíodo com 12h/dia e 12h/noite e temperatura de 28°C (Figura 2).

Após a germinação, 24 plântulas de cada acesso foram transferidas para copos plásticos de 500 mL, contendo substrato terra preta + esterco + pó de coco (1:1:1), mantidos

em telado, com irrigação duas vezes ao dia durante 15 minutos, por micro aspersão, na sede da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, SE.



Figura 2. Processo de germinação de sementes de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung em caixas gerbox, forradas com papel germitest e mantidas em câmara BOD.

#### 4.2.2. Produção das progênes e instalação do experimento em campo

As progênes foram levadas no início da estação chuvosa no período de maio a julho de 2017 para o Campo Experimental Jorge do Prado Sobral, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município Nossa Senhora das Dores, SE (Figura 3). Segundo a classificação de Köppen, a temperatura média anual é de 27°C, umidade relativa de 60% e precipitação média anual de 1000 mm, 80% no período chuvoso, que ocorre de abril a setembro e 20% no período seco, de outubro a março, cujas coordenadas geográficas são 10°27'S e 37°11'O e a altitude média é de 200 m. O solo da área experimental é um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico, textura argilosa e de relevo ondulado (Embrapa, 2013).

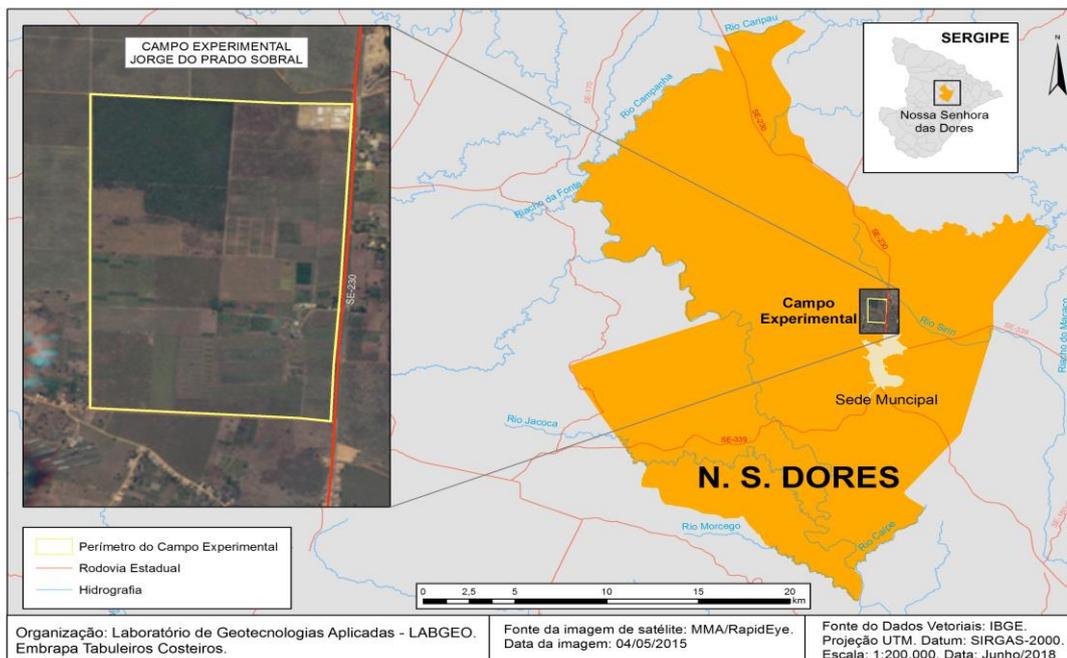


Figura 3. Localização do Campo Experimental Jorge do Prado Sobral, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Nossa Senhora das Dores, Sergipe, Brasil.

As progênies foram codificadas de acordo com o número de origem, ou seja, do acesso no CSIRO (243, 269, 249, 270, 242, 255, 246, 239, 245, 268, 261, 263, 251, 257, 247). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados, com 15 tratamentos, três repetições e oito plantas úteis por parcela, totalizando 360 plantas. Foram separadas entre si por 2 m, e entre linhas também por 2 m, além de uma linha de bordadura externa em cada bloco. As mudas foram plantadas em covas com 25 cm de profundidade. Cada cova foi fertilizada com 30g de superfosfato simples, coberto por uma fina camada de terra antes de colocar a muda. Cada acesso foi devidamente identificado no campo (Figura 4). Para garantir a sobrevivência, as mudas foram regadas eventualmente nos períodos de estiagem.



Figura 4. Implantação do experimento no Campo Experimental Jorge do Prado Sobral - Embrapa Tabuleiros Costeiros, no município de Nossa Senhora das Dores, Sergipe.

#### 4.2.3. Caracterização morfológica

Foi feita a medição e a avaliação de três plantas de cada bloco por acesso, utilizando descritores, 120 dias após o plantio (LUCKOW, 1993), para a realização da caracterização morfológica, onde foram realizadas as seguintes análises:

a) Primeiro florescimento – 120 dias após semeadura; b) Hábito de crescimento da planta – (1) muito prostrado; (9) ereto; c) Densidade de ramificação – (1) muito esparsa; (9) muito densa; d) Comprimento do Caule (mm); e) Comprimento do caule no 10º interno (mm); f) Diâmetro do caule no 10º interno (mm); g) Comprimento da raque central da folha (mm); h) Número de pares de pinas da raque primária; i) Comprimento máximo da pina primária (mm); j) Número de folíolos na maior pina primária; k) Comprimento máximo do folíolo da maior pina primária – (mm); l) Largura do folíolo – (mm); m) Comprimento do pecíolo – (mm); n) Forma de glândula do pecíolo – 1. Estipular curta; 2. Crateiforme; 3. Plana, Comprimento da estípula – (mm); o) Número de vagens a cada 10 pedúnculos/planta; p) Peso de 100 sementes (g).

Para a medição desses descritores foram utilizados um paquímetro digital, uma balança de precisão, uma régua e uma trena, algumas análises foram realizadas no campo experimental Jorge Prado Sobral em Nossa Senhora das Dores e outras na sede da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

#### 4.2.4. Coleta do material vegetal para estudo da diversidade genética

Folhas jovens foram coletadas de três plantas por acesso por bloco das progênies para a análise da diversidade genética. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos, previamente identificados e transportados em caixas térmicas resfriadas até o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju. O material foi armazenado a -80°C para posterior extração de DNA.

#### 4.2.5. Extração de DNA

Foi utilizado 1g da folha para realização da extração do DNA (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). Após o pré-aquecimento a 65°C da solução de extração CTAB 2% (NaCl 5 M; Tris HCl 1 M pH 8,0; EDTA 0,5 M), foi adicionado ao material  $\beta$ -mercaptoetanol e 3 $\mu$ L de proteinase K (10 mg/mL) em cada 1mL de tampão usado. Em seguida as amostras foram incubadas a 65°C no banho-maria, por trinta minutos, homogeneizadas a cada dez minutos, e mantidas em repouso por mais trinta minutos. Foram feitas extrações utilizando primeiramente 500  $\mu$ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e depois utilizando 400  $\mu$ L de isopropanol gelado permanecendo em overnight -20°C. O precipitado obtido foi lavado por três vezes, sendo duas lavagens com etanol 70% e uma vez com etanol 100%. Após a secagem, o DNA foi ressuscitado em 44  $\mu$ L de tampão TE (Tris-HCl 100 mM pH 7,4 e 1mM de EDTA) tratado com 6  $\mu$ L de RNase (20mg/ml) e finalizado com incubação a 37°C por trinta minutos.

#### 4.2.6. Eletroforese, quantificação do DNA e diluição

A avaliação da qualidade do DNA foi realizada pelo método da eletroforese em gel de agarose a 0,8%, no qual foram utilizadas alíquotas de 2  $\mu$ L de cada amostra, 8  $\mu$ L de água MilQ esterilizada e 2  $\mu$ L de solução de carregamento (azul de bromofenol 0,01%; glicerol 40%). A eletroforese horizontal foi realizada durante 45 minutos a 76 V, 38 mA e 120 W. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio, onde permaneceu imerso por cerca de 40 minutos e em seguida fotodocumentado pelo equipamento Gel doc L-pix HE (Loccus Biotecnologia, Brasil). As concentrações das amostras de DNA foram observadas em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). As soluções de trabalho de DNA (10 ng/ml) foram preparadas diluindo as amostras em solução tampão TE e em seguida armazenadas a -20°C.

#### 4.2.7. Teste e seleção de primers ISSR

Foram testados 15 primers em gel de agarose 2% (Tabela 1). Cada reação foi realizada contendo 1  $\mu$ L de DNA genômico (10 ng/ $\mu$ L), 1,0  $\mu$ L de cada iniciador (5 mM), 14,8  $\mu$ L de água MilQ esterilizada, 2  $\mu$ L de tampão de reação 10X, 0,6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 0,4  $\mu$ L de dNTP (10 nM), 0,2 de Taq polimerase (5U/ $\mu$ L), totalizando volume final de reação de 20  $\mu$ L.

Tabela 1. Primers ISSR testados em *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung, respectivas sequências e temperaturas de anelamento.

Primers	Sequência	Ta (°C)
ISSR 1	CAC ACA CAC ACA GG	51,0
ISSR 2	CTC TCT CTC TCT CTC TAC	51,0
ISSR 3	CTC TCT CTC TCT CTC TTG	51,0
ISSR 4	CAC ACA CAC ACA AC	51,0
ISSR 5	CTC TCT CTC TCT CTC TGC	44,0
ISSR 6	CAC ACA CAC ACA AG	44,0
ISSR 7	CAC ACA CAC ACA GT	44,0
ISSR 8	GAG AGA GAG AGA GG	39,0
ISSR 9	GTG TGT GTG TGT CC	39,0
ISSR 10	GAG AGA GAG AGA CC	39,0
ISSR 11	GTG TGT GTG TGT CC	39,0
ISSR 12	CAC CAC CAC GC	39,0
ISSR 13	GAG GAG GAG GC	39,0
ISSR 15	CTC CTC CTC GC	52,0

\*Temperatura de anelamento

#### 4.2.8. Reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese e fotodocumentação

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas contendo 1  $\mu$ L de DNA genômico (10 ng/ $\mu$ L), 1,0  $\mu$ L de cada iniciador (5 mM), 14,8  $\mu$ L de água MilQ esterilizada, 2

$\mu\text{L}$  de tampão de reação 10X, 0,6  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 0,4  $\mu\text{L}$  de dNTP (10 nM), 0,2 de Taq polimerase (5U/ $\mu\text{L}$ ), totalizando volume final de reação de 20  $\mu\text{L}$ . Em seguida, o material foi amplificado em termociclador Proflex<sup>®</sup>, onde as amostras foram submetidas à desnaturação a 94 °C por quatro minutos, seguida por 40 ciclos de amplificação. A cada ciclo houve a desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos. Após os ciclos de reação, o processo foi encerrado com uma extensão final a 72 °C por 7 minutos, seguida de resfriamento a 10 °C. Produtos das reações, em gel de agarose 2%, foram submetidos à eletroforese com voltagem de 250 V, 145 mA e 120 W, durante três horas. Para padronização de bandamento, foi utilizado 10  $\mu\text{L}$  do marcador de peso molecular de 100 pb. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio, onde permaneceu imerso por cerca de 40 minutos e em seguida fotodocumentado pelo equipamento Gel doc L-pix HE (Loccus Biotecnologia, Brasil).

#### 4.2.9. Identificação do número ótimo de bandas

Para verificar se o número de marcadores gerados foi suficiente para analisar o grupo amostral, foram realizados Bootstraps a partir de simulações com reamostragens de diferentes tamanhos (a partir de 60 com incremento=10), sendo cada uma repetida 5.000 vezes por aplicação do software DBoot (COELHO, 2000).

#### 4.2.10. Análise dos dados

Os dados morfológicos foram analisados em delineamento em blocos completos ao acaso utilizando modelos mistos, sendo a progênie considerada como efeito fixo, enquanto os blocos e o resíduo como efeito aleatório, utilizando-se o procedimento MIXED do SAS<sup>®</sup>. Quando significativa, as médias entre acessos foram comparadas pelo teste de Tukey. Significância foi declarada a  $P \leq 0.05$ . A análise de componentes principais baseou-se numa matriz de correlação e foi calculada usando uma entrada de médias ajustadas e dois gráficos foram gerados para ilustrar as relações entre os acessos e as variáveis estudadas. Os gráficos foram gerados ao traçar as entradas de acordo com suas pontuações do primeiro e segundo componentes principais. A correlação de Pearson foi usada para determinar a relação entre as variáveis estudadas e os coeficientes de correlação foram calculados usando o MINITAB<sup>®</sup> e o procedimento PROC CORR do programa estatístico SAS<sup>®</sup>.

Para os dados moleculares foi calculado o número de alelos observados ( $N_a$ ); número de alelos efetivos ( $N_e$ ); Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e o Índice de Shannon (I), utilizando o programa Genalex 6.5. Os valores de correlação e estresse foram estimados no programa GENES (Cruz, 2006). As similaridades genéticas entre os indivíduos foram calculadas utilizando o coeficiente de Jaccard e a construção do dendrograma foi obtida com o auxílio do programa NTSYS-pc 2.0, baseados na matriz de similaridade genética utilizando o método UPGMA. A análise da estrutura genética, baseado em estatística bayesiana, foi estimada utilizando o software 'Structure'. Utilizou-se o programa 'Structure Harvester' para inferir o número de grupos ( $\Delta K$ ) nos quais os genótipos encontram-se estruturados.

### 4.3. Resultados e Discussão

#### 4.3.1. Caracterização morfológica

O dendrograma de Similaridade (Figura 5) aglutinou os grupos com características morfológicas semelhantes, onde se observou que os acessos foram separados em dois grandes grupos: o primeiro formado pelos acessos 239, 247 e 257 e o segundo grupo dividido em três subgrupos. Os acessos 242, 243, 263, 269, 245, 255, 246, 270 e 261 foram mais próximos entre si do que os acessos 249 e 268, indicando maior diferença fenotípica entre eles.

Apesar de serem plantas da mesma espécie, ocorreram diferenças morfológicas entre os acessos. Esse comportamento também foi observado por Pengelly e Liu (2001) e Gardiner e

Burt (1995), em estudos sobre diferenças entre populações de jureminha para caracteres quantitativos.

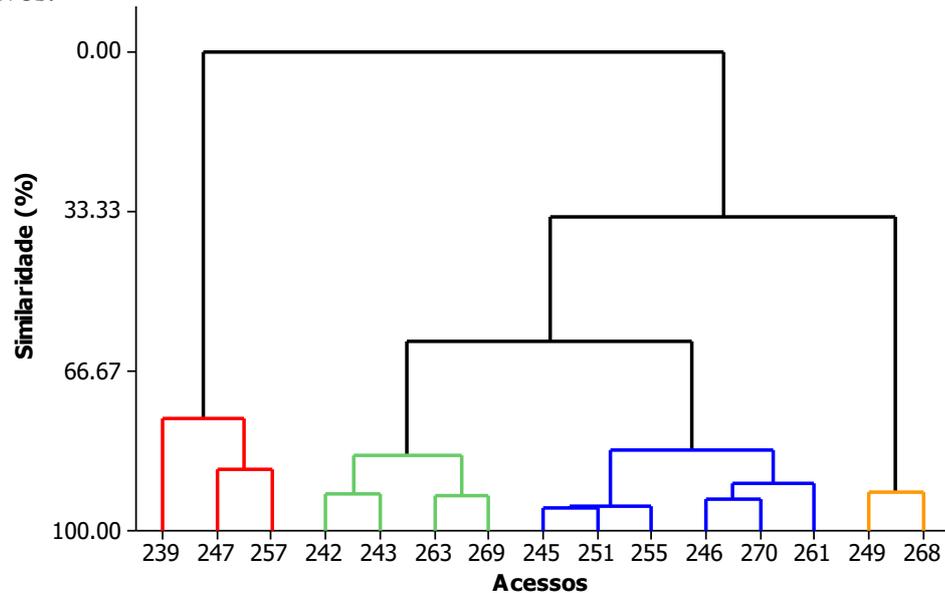


Figura 5. Dendrograma de similaridade entre 15 acessos de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung.

Nas figuras 6 e 7 relacionou-se cada acesso com a variável que o influenciou através de vetores, diferenciando-o dos demais. Os acessos 247, 268 e 249 foram os mais distantes, e isso pode estar diretamente relacionado com as variáveis VP (número de vagens por pedúnculo), CF (comprimento do folíolo) e CB (comprimento da base).

Na análise da distribuição (Figura 6) observou-se que houve agrupamentos entre os acessos, onde se dividiram em três grandes grupos - os mesmos grupos já verificados no dendrograma de similaridade; o grupo dos acessos 239, 247, 257, influenciadas pelas variáveis VP (Vagem por pedúnculo), PS (Peso da Semente) e NR (Número de Ramificações) e o grupo dos acessos 249 e 268 influenciados pelos descritores AL (Altura), CB (Comprimento da Base), DB (Diâmetro da base) e LF (Largura do folíolo) foram as progênes mais divergentes. Em populações autógamas, como é o caso da espécie *Desmanthus*, podem ser tão variáveis geneticamente quanto às populações alógamas (PILAR, 1994), isto porque grande parte da variabilidade genética é mantida nas populações como adaptação à heterogeneidade ambiental no tempo e no espaço. Descritores com a maior contribuição para a divergência são os mais importantes para o programa de reprodução (OLIVEIRA et al., 2016).

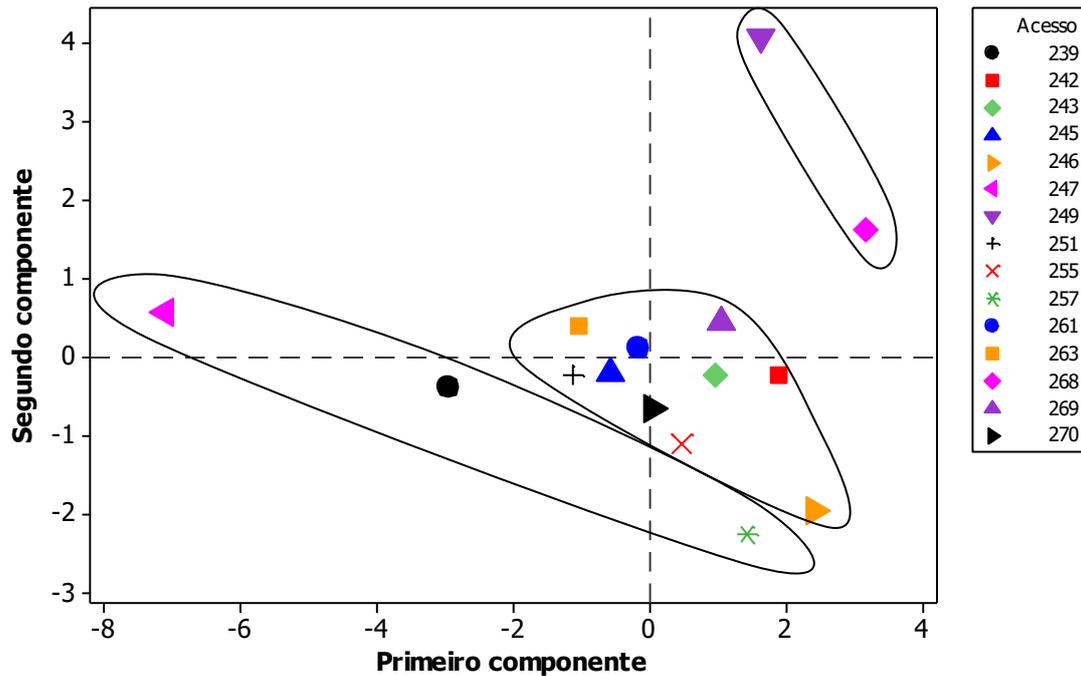


Figura 6. Gráfico de distribuição dos acessos com relação aos componentes principais.

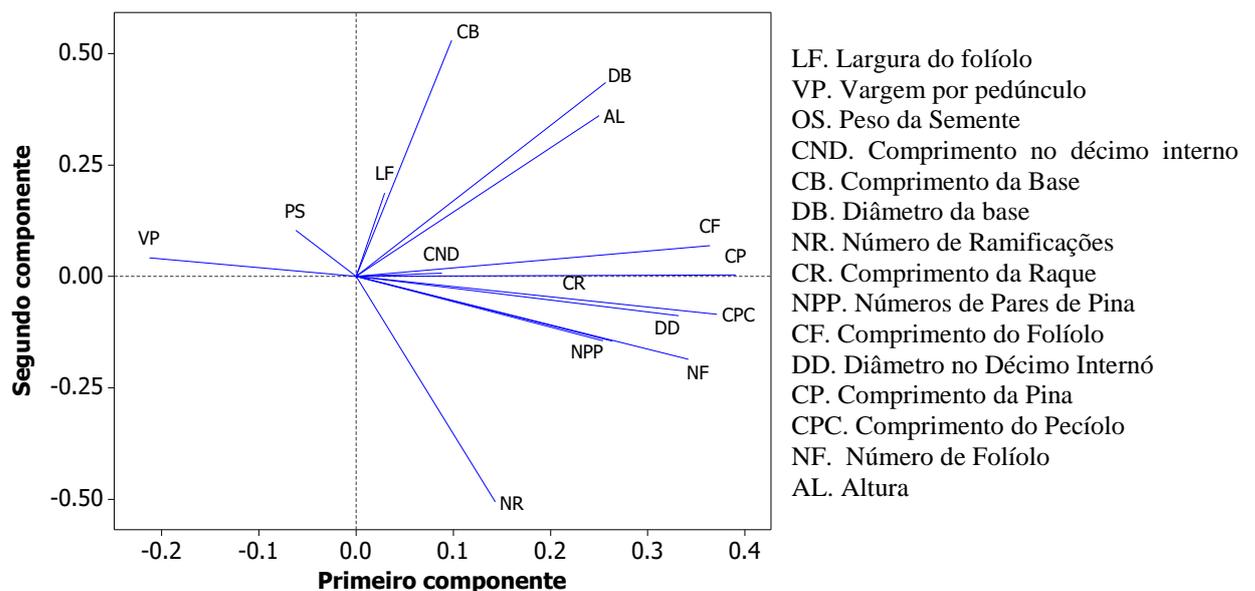


Figura 7. Gráfico de vetores dos componentes principais.

Foram estimados os coeficientes de correlação de Pearson, onde coeficiente de correlação é uma medida que reflete o grau de associação entre as características da espécie estudada. Para fins de seleção, o seu conhecimento é de extrema importância porque indica como a triagem para um caráter vai influenciar na expressão dos demais (NICOLAI, 2017). Tal parâmetro é de suma importância para os programas de melhoramento, uma vez que estes, além de visar aprimorar um caráter tomado como principal, buscam também manter ou melhorar a expressão de outros caracteres simultaneamente (LOPES *et al.*, 2002).

A correlação entre as variáveis fenotípicas é uma análise importante para futuros projetos de melhoramento, onde podemos identificar quais as variantes com melhor

correlação. Percebeu-se que os descritores comprimento da pina, número de folíolo e comprimento do folíolo tiveram alta relação com o comprimento do raque. Da mesma forma, foi observado que o comprimento do pecíolo se correlacionou positivamente com o comprimento do folíolo, número de folíolos, comprimento de pina e comprimento da raque (Figura 8). Embora a análise de correlação seja importante para entendimento das inter-relações entre as características, valores altos não necessariamente implicam a relação de causa e efeito (LOPES *et al.*, 2002), pois devemos avaliar somentes as características com alta correlação biológica e não observar somente os números.

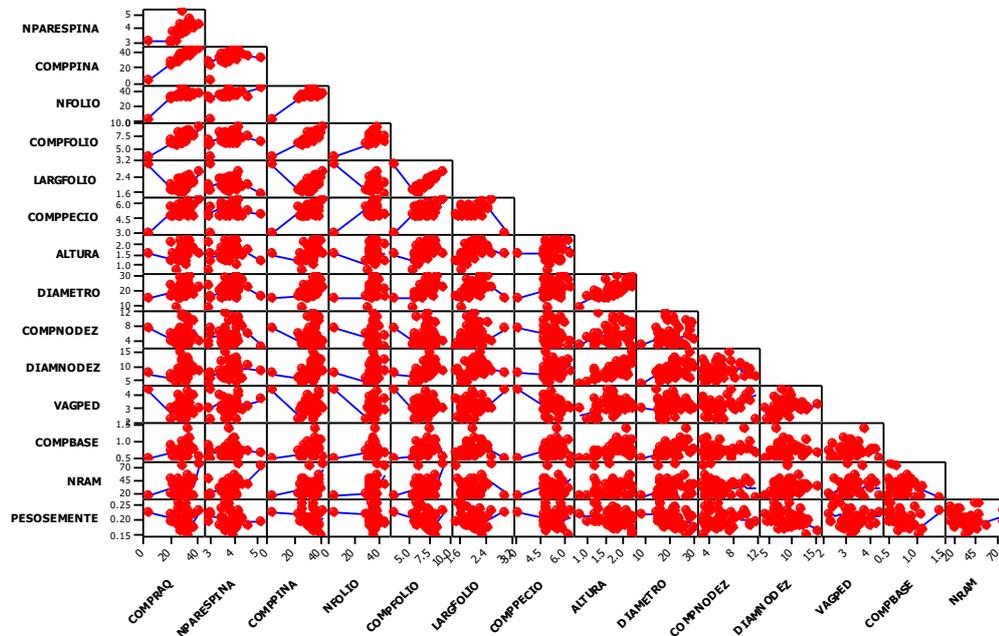


Figura 8. Representação gráfica da correlação entre as variáveis analisadas.

#### 4.3.2. Caracterização molecular

Na caracterização molecular, dos 15 *primers* testados, oito foram utilizados para analisar a diversidade genética em acessos de *Desmanthus* por apresentarem alta reprodutibilidade. Os *primers* escolhidos para avaliar a diversidade genética amplificaram 38 fragmentos, sendo a maior porcentagem de polimorfismo exibida pelo *primer* ISSR13 (100%) e a menor por ISSR12 que apresentou apenas bandas monomórficas (0% de polimorfismo) (Tabela 2).

Tabela 2. Relação dos *primers* ISSR, número total de bandas, porcentagem de polimorfismo e amplitude de bases, gerados pelas reações de PCR para estudo da diversidade genética de acessos de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung.

<i>Primers</i>	Nº de Bandas	Nº de Bandas Polimórficas	Porcentagem de polimorfismo (%)
ISSR 2	7	5	71
ISSR 3	3	2	66
ISSR 4	4	2	50
ISSR 5	6	5	83
ISSR 7	7	6	85
ISSR 12	2	0	0
ISSR 13	6	6	100
ISSR 15	3	1	33
	38	27	61

As estimativas de correlação apresentaram valor de 0,998 e o valor de estresse foi de 0,018. Valores de estresse menores ou iguais a 0,05 indicam que as estimativas são precisas (KRUSKAL, 1964). Para *Desmanthus* sp. o número ótimo de bandas encontrados por Costa et al. (2017) foi 83, resultando em um valor de estresse aproximado a zero. Para *Copernicia prunifera*, a diversidade genética foi estimada com 76 bandas (VIEIRA *et al.*, 2015).

O número médio de alelos ( $N_A$ ) foi 1,76 e o número de alelos observados ( $N_E$ ) foi 1,49. O índice de diversidade de Nei ( $H_E$ ), assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi de 0,28. O índice de Shannon (I) foi 0,42, considerado moderado a baixo (Tabela 3). Os índices variam de 0 a 1, de diversidade genética zero a máxima (GIUSTINA *et al.*, 2014). Costa et al (2017), avaliando a diversidade genética de acessos de *Desmanthus* de Pernambuco, encontraram um índice de Shannon moderado (0,361). Em estudos com Trevo branco (*Trifolium repens* L.), uma autógama, a diversidade genética média foi de 0,175 e para *Vigna unguiculata* L. o valor médio foi de 0,6383 (IGWE et al., 2017).

Tabela 3. Número de indivíduos, Número de alelos observados ( $N_A$ ), Número de alelos efetivos ( $N_E$ ), Índice de Shannon (I), Heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) e Heterozigosidade observada ( $H_O$ ) para as amostras de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung obtidos por marcadores ISSR.

Número de indivíduos	$N_A$	$N_E$	I	$H_E$	$H_O$
15	1,76	1,49	0,42	0,28	0,29

A técnica de ISSR possibilitou a construção da matriz de similaridade de Jaccard que apresentou valores variando entre 0,50 e 0,97 (Tabela 4). Os pares formados pelas progênies 269x243, 257x243 e 257x247 foram os mais semelhantes geneticamente com índices 0,97, 0,91 e 0,91, respectivamente. Em contrapartida, os pares 246x243 e 251x246 obtiveram menores valores (0,50), indicando uma maior diferenciação genética entre estes.

Tabela 4. Matriz de similaridade de Jaccard utilizando oito *primers* pela técnica ISSR entre 15 genótipos de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung.

	Plantas														
Plantas	243	269	249	270	242	255	246	239	245	268	261	263	251	257	247
243	1,00														
269	0,97	1,00													
249	0,80	0,82	1,00												
270	0,87	0,90	0,79	1,00											
242	0,65	0,67	0,58	0,74	1,00										
255	0,55	0,57	0,48	0,63	0,85	1,00									
246	0,50	0,52	0,53	0,57	0,61	0,48	1,00								
239	0,76	0,78	0,74	0,80	0,68	0,63	0,57	1,00							
245	0,61	0,63	0,55	0,64	0,70	0,80	0,57	0,64	1,00						
268	0,61	0,63	0,55	0,64	0,70	0,64	0,57	0,59	0,81	1,00					
261	0,88	0,90	0,79	0,87	0,69	0,59	0,53	0,87	0,66	0,66	1,00				
263	0,83	0,80	0,76	0,76	0,61	0,52	0,43	0,71	0,53	0,53	0,82	1,00			
251	0,77	0,74	0,70	0,71	0,65	0,55	0,50	0,66	0,61	0,61	0,76	0,88	1,00		
257	0,91	0,88	0,73	0,84	0,63	0,53	0,48	0,74	0,59	0,59	0,85	0,86	0,80	1,00	
247	0,88	0,85	0,81	0,82	0,61	0,52	0,52	0,82	0,58	0,58	0,88	0,89	0,83	0,91	1,00

A formação de três grupos foi observada considerando a similaridade de 0,67 (Figura 9). O primeiro grupo teve a progênie 246, considerado o mais isolado. O segundo grupo foi formado pelas progênies 242; 255; 245 e 268. O terceiro grupo foi constituído por 239; 249; 251; 263; 247; 257; 270; 261; 269 e 243. Todos os acessos foram considerados distintos e não tiveram duplicatas. A ocorrência de duplicatas em bancos de germoplasma encarece e dificulta a manutenção do material, resultando em problemas de organização e acessos ao recurso genético (GONÇALVES *et al.*, 2008).

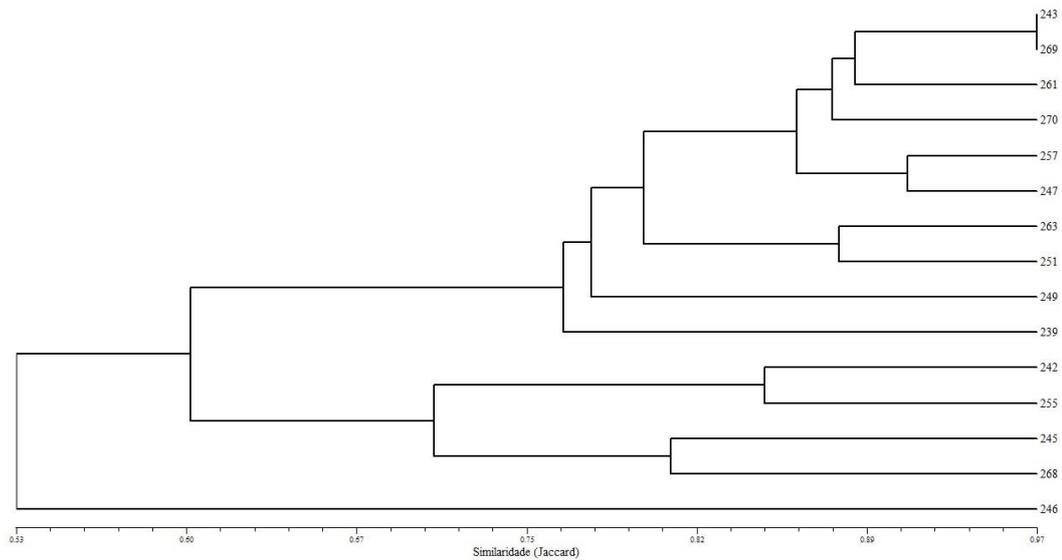


Figura 9. Dendrograma obtido pelo método UPGMA com base no índice de similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard (1908) para 15 genótipos de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung.

As distâncias genéticas foram utilizadas na Análise de Componentes Principais (ACoP). Quatro agrupamentos foram identificados e a soma das duas primeiras coordenadas explicaram 52,38% da variabilidade (Figura 10). Com essa análise foram formados os grupos 1 (progênie 246), grupo 2 (255; 245; 268 e 242), grupo 3 (239; 270; 261; 269; 249 e 243) e grupo 4 (247; 257; 263 e 251). Esses resultados reforçam a eficiência no estudo de diversidade genética utilizando marcadores ISSR.

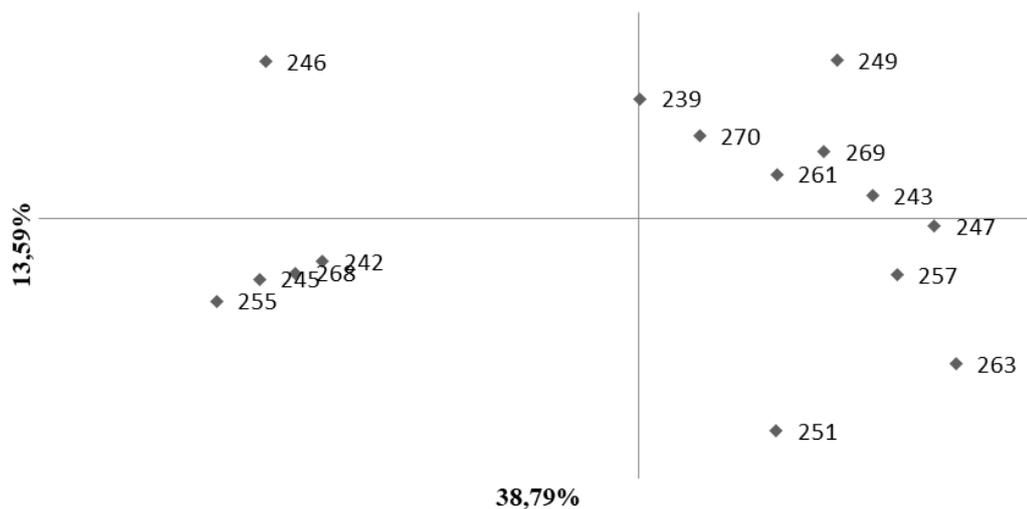


Figura 10. Análise de coordenadas principais (ACoP).

A análise Bayesiana foi utilizada para avaliar a estrutura genética das progênies que irão constituir o Banco de Germoplasma de *Desmanthus* (Figura 11). O software Structure estima o número mais provável de clusters (K) calculando a probabilidade de log de dados para cada valor de K e pela estatística  $\Delta K$  de EVANNO *et al.* (2005). O K que melhor representa o conjunto de dados é K=4. O primeiro grupo é representado pelas progênies 245, 255, 268 e 242. O segundo conjunto é formado por 269, 261, 270, 249, 239 e 243. A progênie 246

apresenta-se mais isolada, formando um grupo único e o quarto grupo contém 263, 251, 257 e 247. Esses resultados corroboraram com a análise de componentes principais (ACoP).

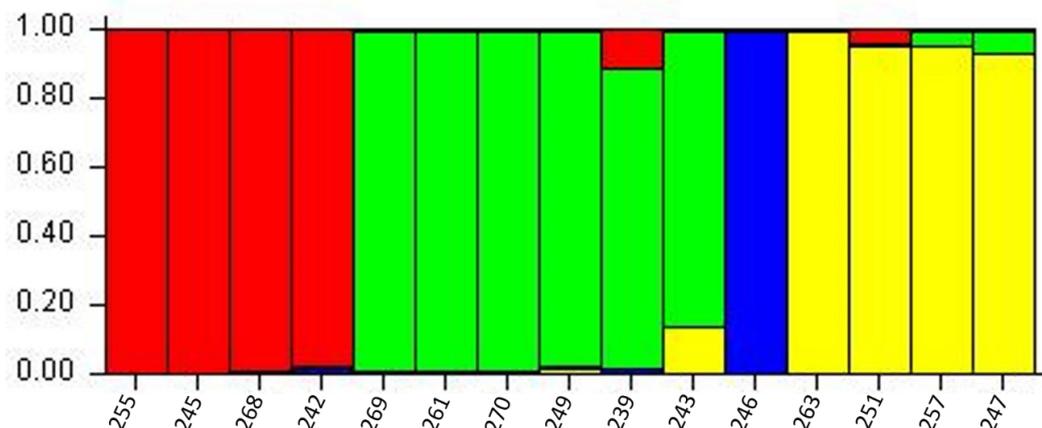


Figura 11. Representação dos 15 genótipos de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung em grupos segundo dados moleculares com oito *primers* ISSRs, utilizando o programa 'Structure' ( $\Delta K=4$ ).

#### 4.4. Conclusões

Pelo uso dos descritores morfológicos, as progênies 239, 247, 249, 257 e 268 se destacaram por terem sido os acessos mais divergentes em algumas características e podem ser indicadas tanto para implantação do BAG como para futuras pesquisas sobre sistema de produção.

Os marcadores ISSR utilizados foram eficazes para o estudo da diversidade genética de *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung, demonstrando intermediária diversidade entre as progênies. As progênies 242, 245, 246, 255 e 268 foram as mais divergentes e são recomendadas para implantação do BAG, pesquisas sobre sistema de produção e programa de melhoramento genético.

#### 4.5. Referências Bibliográficas

CALDAS, P.M.S.; BORGES, C.M.A.; MEIRA, A.M.V. Potencial forrageiro da caatinga, fenologia, métodos de avaliação da área foliar e o efeito do déficit hídrico sobre o crescimento de plantas. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 7, n. 4, 2006.

COELHO, A.S.G. **BOOD: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap** (software). Goiânia: Laboratório de Genética Vegetal, ICB-UFG, 2000.

COSTA, J.C.; FRACETTO, G.G.M.; FRACETTO, F.J.C.; SANTOS, M.V.F.; LIRA, M.A.J. Genetic diversity of *Desmanthus* sp accessions using ISSR markers and morphological traits. **Genetics and Molecular Research**, p. 16, v. 2: gmr16029667. 2017.

CRUZ C.D. **Programa Genes: Análise Multivariada e Simulação**. Viçosa: UFV, 175p. 2006.

CUI, Z.; CARTER JÚNIOR, T.E.; BURTON, J.W.; WELLS, R. Phenotypic diversity of modern Chinese and North American soybean cultivars. **Crop Science**, v. 41, n. 6, p. 1954-1967, 2001.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema Brasileiro de Classificação do Solo**. 3ª Ed., Brasília, DF: Embrapa, 2013. 353p.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

FERREIRA, J.J.; GARCIA-GONZÁLEZ C.; TOUS, J.; ROVIRA, M. Genetic diversity revealed by morphological traits and ISSR markers in hazelnut germplasm from northern Spain. **Plant Breeding**, v. 129, p. 435-441, 2010.

GARDINER, C.P.; BURT, R.L. Performance characteristics of *Desmanthus virgatus*. IN: contrasting tropical environments. **Tropical Grasslands**, v. 29, n. 3, p. 183-187, 1995.

GIUSTINA, L.D.; LUZ, L.N.; VIEIRA, F.S.; ROSSI, F.S. Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). **Genetics Molecular Research**, v. 13, p. 3510-3519, 2014.

GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; SUDRÉ, C.P.; BENTO, C.S. Divergência genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparação com descritores multicategóricos. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 364-370, 2008.

IGWE, D.O.; AFIUKWA, C.A.; UBI, B.E.; OGBU, K.I.; OJUEDERIE, O.B.; UDE, G.N. Assessment of genetic diversity in *Vigna unguiculata* L. (Walp) accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) and start codon targeted (SCoT) polymorphic markers. **BMC Genetics**, v. 18, n. 98, 2017.

ISSHIKI, S.; IWATA, N.; KHAN, M.R. ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. **Scientia Horticulturae**, v. 117, p.186-190, 2008.

KRUSKAL, J.B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. **Psychometrika**, v. 29, p. 1-27, 1964.

LIU, D.; HE, X.; LIU, G.; HUANG, B. Genetic diversity and phylogenetic relationship of Tadehagi in southwest China evaluated by inter-simple sequence repeat (ISSR). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, p. 679-688, 2011.

LOPES, A.C.A.; VELLO, N.A.; PANDINI, F.; ROCHA, M.M.; TSUTSUM, C.Y. Variabilidade e correlações entre caracteres em cruzamentos de soja. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 2, p. 341-348, 2002.

LUCKOW, M. *Desmanthus* (Leguminosae-Mimosoideae). **Systematic Botany Monographs**. Australia, v. 38, 166p, 1993.

MOURA, W.M.; CASALI, V.W.D; CRUZ, C.D.; LIMA, P.C. Divergência genética em linhagens de pimentão em relação a eficiência nutricional de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 217-224, 1999.

NICOLAI, A. B.; LIMA, R. C.; TOMAZ, R. S. Correlações fenotípicas e análise de trilha para componentes de produtividade agrônômica de cinco variedades de soja, semeados na região da Alta Paulista. **Revista Científica**, ANAP Brasil, v. 10, n. 20, 2017.

OLIVEIRA, R.S.; QUEIRÓZ, M.A.; ROMÃO, R.S.; SILVA, G.C. Genetic diversity in accessions of *Stylosanthes* spp. using morphoagronomic descriptors. **Caatinga**, v. 29, p. 101-112, 2016.

PENGELLY, B. C.; LIU, C.J. Genetic relationships and variation in the tropical mimosoid legume *Desmanthus* assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 48, n. 1, p. 91-99, 2001.

PENGELLY, B.C.; CONWAY, M.J. Pastures on cropping soils: which tropical pasture legume to use? **Tropical Grasslands**, v.34, p.162-168, 2000.

PILLAR, V.D.P. **Estratégias adaptativas e padrões de variação da vegetação**. UFRGS. Departamento de Botânica. 1994.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 2, 1999. Disponível em:  
<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio09/extracao.pdf>. Acesso em: 13Abr2018.

VIEIRA, F.A.; SOUSA, R.F.; SILVA, R.A.R.; FAJARDO, C.G. Diversidade genética de *Copernicia prunifera* com o uso de marcadores moleculares ISSR. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, p. 525-531, 2015.