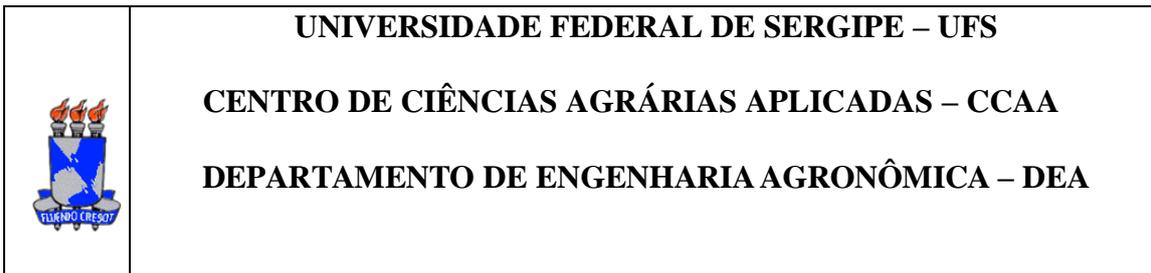


JOÃO PEDRO MENEZES DA CRUZ

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE *Desmanthus leptophyllus*

São Cristóvão – SE

Outubro - 2023



DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE *Desmanthus leptophyllus*

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Agrônômica – Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

APROVADO em:

ORIENTADO: João Pedro Menezes da Cruz



Prof. Dr. José Henrique de Albuquerque Rangel (Orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br RENATA SILVA MANN
Data: 18/10/2023 11:44:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br JAILSON LARA FAGUNDES
Data: 19/10/2023 10:40:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dr^ª. Renata Silva Mann
(Banca examinadora)

Prof. Dr. Jailson Lara Fagundes
(Banca examinadora)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me manteve firme para conseguir alcançar meus objetivos e aos meus familiares e amigos, que me incentivaram e ajudaram para que eu pudesse concluir mais uma etapa de minha jornada.

“O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos” – Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me proporcionar saúde, força e discernimento para conseguir alcançar minhas metas e não me deixar abalar diante de todas as dificuldades que tive em minha frente.

Agradeço aos familiares em especial aos meus pais Gabriel e Zulmira pela educação que me deram, por me apoiarem em minhas decisões bem como me proporcionaram condições para que eu pudesse alcançar meus objetivos e por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis. Agradeço a minha irmã Gabriela pelo apoio e pelo companheirismo durante esta etapa de minha vida.

Agradeço aos meus amigos por estarem presente e sempre dispostos a me ajudar em qualquer situação e aos colegas de curso por toda troca de conhecimento gerada.

Agradeço a Embrapa Tabuleiros Costeiros por proporcionar espaço e material para que eu pudesse realizar o presente trabalho e aos técnicos de laboratório em especial ao Silvio Gomes pelos ensinamentos e contribuição no trabalho.

Agradeço a Dr^a. Ana Veruska Cruz e Dr^a. Juliana Souza pela atenção, por toda ajuda e contribuição no trabalho sempre que necessário.

Agradeço ao meu orientador Dr. José Henrique Albuquerque Rangel por confiar no meu trabalho e por todo o conhecimento passado, serviu tanto para o meu crescimento profissional bem como para o meu crescimento pessoal, agradeço a amizade e convivência no período de bolsa e estágio.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	6
<u>LISTAS DE TABELAS</u>	7
<u>RESUMO</u>	8
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	9
<u>2. REFERENCIAL TEÓRICO</u>	11
2.1 <u>Gênero <i>Desmanthus</i></u>	11
2.2 <u><i>Desmanthus leptophyllu</i></u>	12
2.3 <u>Parâmetros Genéticos e de variabilidade</u>	12
2.4 <u>Caracterização molecular</u>	13
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	14
3.1 <u>Extração de DNA</u>	14
3.2 <u>Quantificação Gel eletroforese e diluição</u>	15
3.3 <u>Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e fotodocumentação</u>	16
3.4 <u>Análise estatística</u>	18
<u>4. RESULTADOS E DISCURSÃO</u>	19
<u>5. CONCLUSÃO</u>	22
<u>6. REFERÊNCIAS</u>	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Acessos de <i>D. leptophyllus</i> dispostos na estufa telada da Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.....	14
Figura 2: NanoDrop 2000c (Thermo Scientific)	15
Figura 3: Cuba para gel de eletroforese horizontal.....	16
Figura 4: Termociclado usado para amplificação de DNA.....	17
Figura 5: Fotodocumentador Hel doc L-pix HE.....	18
Figura 6: Gel fotodocumentado contendo bandas amplificadas.....	18
Figura 7: Dendrograma de similaridade entre 103 indivíduos representando 13 acessos de <i>D. leptophyllus</i> avaliados com primers ISSR	21

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1: Lista de primers ISSR utilizados para caracterização molecular de <i>Desmanthus leptophyllus</i>	16
TABELA 2: Lista de primers ISSR utilizados com suas respectivas sequências e temperatura de anelamento	19
TABELA 3: Diversidade genética estimada pelo Índice de Shannon (I) e heterozigosidade esperada (He) e heterozigosidade esperada ajustada (uHE para acessos de <i>Desmanthus leptophyllus</i> avaliados com primers ISSR	20
TABELA 4: Análise de variância molecular (AMOVA) de 103 indivíduos representando treze acessos de <i>Desmanthus leptophyllus</i> avaliados com primers ISSR. Aracaju, SE.....	21

RESUMO

Desmanthus é um gênero do grupo das leguminosas, que possui como principal característica o alto teor de proteína, chegando a 23% em suas folhas além de boa aceitabilidade pelos animais e de não possuir toxicidade na alimentação. O gênero é nativo das regiões tropicais e subtropicais das Américas, incluindo o Brasil. Dentro deste gênero está a espécie *Desmanthus leptophyllus*. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estimar a diversidade genética de acessos de *Desmanthus leptophyllus*, pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Para a extração do DNA foram coletadas folhas jovens de doze acessos contendo 8 repetições BAGDes (192, 179, 177, 105, 229, 180, 169, 21, 187, 160, 164, 29) e 1 acesso contendo 7 repetições (55). Posteriormente foi realizada a quantificação, diluições (10 nanogramas/ μ L) e Reações em cadeia da Polimerase (PCR) utilizando marcadores ISSR. Logo após as amostras foram submetidas a eletroforese e os géis foto documentados. Obteve-se índice de Shannon de 0,369, sendo considerado moderado baixo e, heterozigosidade esperada média de 0,263 também considerada baixa. A variação genética foi maior dentro dos acessos do que entre os acessos. Assim para o BAG de *D. leptophyllus* da Embrapa Tabuleiros Costeiros há baixa diversidade entre os acessos e que os primers ISSR são ferramentas importantes na caracterização molecular da espécie.

Palavras-chave: Caracterização molecular, Banco ativo de germoplasma.

1. INTRODUÇÃO

A busca por sistemas de produção de alimentos sustentáveis tornou-se uma questão global significativa devido à crescente demanda por alimentos, representando um desafio importante na necessidade de suprir essa lacuna (MATOS et al., 2018). A produção de alimentos com maior eficiência no uso de insumos garante a preservação dos ecossistemas onde o desafio é gerar conhecimento e tecnologia que garanta a estabilidade dos ecossistemas (MEDEIROS; ESPINOLA, 2019).

Neste contexto, sistemas agrícolas que buscam sustentabilidade necessitam de materiais genéticos que possuam como características, além de produtividade, resistência a estresses bióticos e abióticos (MEDEIROS & ESPINOLA, 2019). O uso de espécies forrageiras nativas vem sendo uma alternativa que além de se mostrarem produtivas nas condições ambientais impostas, garantem a manutenção da biodiversidade, (GIULIETTI et al, 2004). Nesse cenário ganham importância plantas do gênero *Desmanthus*, onde se acredita que este apresente uma enorme capacidade para pastagens no semiárido. Pois é resistente a períodos de seca, possui boa capacidade de rebrota e produz uma alta quantidade de sementes (GARDINER; BURT, 1995).

Desmanthus é um gênero de plantas que está inserido no grupo das leguminosas. Possui como característica marcante o alto teor de proteína chegando a 23% em suas folhas, além de apresentar uma boa aceitabilidade pelos animais e não possuir toxicidade, podendo ser consumido pelos mesmos. Pode ser encontrado de forma natural entre as regiões tropicais e subtropicais das Américas, incluindo o Brasil (COSTA et al., 2017). Esse gênero conta com cerca de 24 espécies (MUIR et al., 2014) e dentre elas está *Desmanthus leptophyllus* (Kunth) M. T. Strong & H. B. Gillis que se caracteriza por ser um arbusto ereto, podendo chegar a 3 metros de altura e de maneira geral, possui muitas ramificações (LUCKOW, 1993). *D. leptophyllus* possui ocorrência natural no Nordeste brasileiro, tornando os estudos com essa espécie importantes para a comunidade nordestina.

Devido a sua importância, foram lançadas três cultivares de *Desmanthus*, dentre elas a Cultivar “Bayamo”, (PENGELLY; LIU, 2001) possuindo algumas limitações, como por exemplo a dificuldade no estabelecimento. Pesquisadores acreditam que o gênero pode fornecer forragem para as regiões de ocorrência (JONES; BRANDÃO, 1998).

As plantas pertencentes ao gênero *Desmanthus* exibem variabilidade genética, o que se torna um aspecto importante na procura por acessos que favoreçam uma alta produção de forragem e permitam a adaptação às alterações ambientais (DAUFRESNE; RENAULT, 2006). Com isso, estudos genéticos ganham importância, como por exemplo a caracterização molecular de acessos.

A caracterização molecular pode ser descrita como a aferição e documentação de características herdáveis das plantas, que podem ser expressas em diferentes ambientes. Com isso é possível realizar a separação genética de plantas em uma coleção. A caracterização molecular tem importância na conservação *in situ* e *ex situ* como também em programas de melhoramento genético, justamente pelas informações que são geradas permitindo observar a dinâmica populacional e fazer um manejo adequado do BAG (Banco Ativo de Germoplasma) de determinada espécie (AZEVEDO, 2010).

O presente trabalho teve como objetivo estimar a diversidade genética de acessos de *D. leptophyllus*, pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

2. Referencial teórico

2.1 Gênero *Desmanthus*

Espécies do gênero *Desmanthus* são popularmente conhecidas pelo nome Jureminha e estão dentro do grupo das leguminosas, ganhando importância por algumas características, dentre elas, o alto teor de proteína, persistência no período seco, capacidade de rebrota e agressividade na colonização (CALDAS et al., 2006; RANGEL et al., 2009). Este gênero não apresenta toxicidade para os animais e contém um bom valor nutricional, tendo um teor proteico por volta de 23% em suas folhas, ocorrendo de forma natural no estado de Sergipe (COSTA et al., 2017). As espécies deste gênero também apresentam alta preferência entre os animais podendo ser consumida *in natura* ou na forma de feno (SANTOS et al., 2010). Este gênero oferece a possibilidade de cumprir o papel do *Stylosanthes* em lugares que esse gênero não possui boa adaptabilidade (RANGEL et al., 2015). O cultivo das espécies do gênero *Desmanthus* é quase inexistente no Brasil, porém na Austrália existem cultivares comerciais (JONES; BRANDON, 1998; COLLINS et al., 2016)

Três cultivares de *Desmanthus* foram lançadas para as empresas em 1995 (PENGELLY; LIU, 2001). A adoção dessas cultivares pela indústria tem sido lenta por uma série de razões dentre elas estão: dificuldade no estabelecimento, pouca competitividade dessas cultivares com gramíneas e baixo rendimento na semeadura (JONES; BRANDÃO, 1998). Apesar de sucesso limitado das cultivares, pesquisadores da Austrália e de outros lugares do mundo acreditam que o gênero pode fornecer forragens importantes para os trópicos e subtropicais (JONES; BRANDÃO, 1998).

O gênero *Desmanthus* é formado por 24 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais das Américas, com maior diversidade no México, onde são encontradas 14 espécies e sul do Texas nos Estados Unidos com 8 espécies (MUIR et al., 2014). As plantas deste gênero ainda podem apresentar adaptações de acordo com a região

fisiográfica que estão inseridas (REID et al., 1983). De acordo com o estudo taxonômico de Luckow (1993) existem cinco espécies deste gênero nativas do Brasil, *D. leptophyllus* Kunth, ocorrendo nos estados da Bahia, Ceará e Minas Gerais; *D. paspalaceus* (Lindm.) Burkart, encontrada nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina; *D. pernambucanus* (L.) Thellung, nos estados da Bahia, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro; *D. tatuhyensis* Hoehne, nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina; e *D. virgatus* (L.) Willd, nos estados da Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (LUCKOW, 1993).

A região nordeste do Brasil pode ser definida como o centro de várias leguminosas (LOIOLA et al., 2010). Em condições específicas dessa região o gênero ocorre naturalmente nas pastagens, consistindo em um dos principais recursos para a produção de ruminantes (CALADO et al., 2016).

2.2 *Desmanthus leptophyllus*

D. leptophyllus são arbustos eretos de 0,4 a 3 metros de altura lenhoso na base e geralmente muito ramificado, raiz principal cilíndrica e lenhosa (LUCKOW et al., 1993).

Distribuída em toda a América Central e norte da América do Sul em países como Venezuela, Brasil, Equador, Chile e Peru, em matagais costeiros, pântanos, lugares baldios e beiras de estradas; em solos arenosos, calcários, rochosos e salinos variando entre 0 a 1500 metros de altitude (LUCKOW et al., 1993).

2.3 Parâmetros Genéticos e Variabilidade

Os estudos sobre a diversidade genética e sobre o nível de diferenciação genética entre as populações das espécies são de grande importância para abastecer os estoques genéticos e subsidiar políticas de manejo e exploração desses recursos bem como obter maneiras de conservar esses recursos em nível geográfico e regional (CRUZ, 2005). Desse modo, o estudo da diversidade auxilia o melhorista na seleção de materiais promissores para serem utilizados nos programas de melhoramento (FALEIRO et al., 2011). A

diversidade genética pode ser quantificada por marcadores moleculares ou por marcadores morfológicos (LIRA, 2015).

A distribuição dessa variabilidade entre as populações e dentro das populações é motivada pelo fluxo gênico, sistema de cruzamento e deriva genética (TEMPLETON, 2011). As espécies que possuem alogamia com maior frequência têm níveis mais altos de variabilidade dentro das populações do que espécies onde predomina a autogamia (CANOVÁS et al., 2015).

Conhecendo a estrutura genética de uma população é possível presumir quais fenômenos ecológicos e genéticos atuam sobre elas (CRUZ et al., 2011). A variabilidade genética pode ser definida como a variedade de alelos nos genótipos presentes dentro de uma população em estudo (FRANKHAM et al., 2008). Tal variabilidade é a base para que a seleção natural atue e permita a evolução e adaptação as mudanças ambientais nos organismos (HART; CLARK 2010).

O conhecimento da variabilidade devido às diferenças genéticas existentes através de parâmetros genéticos como herdabilidade, coeficiente de correlação genética e as implicações dos efeitos ambientais sobre estas estimativas, refletidas na interação genótipo x ambiente, é de fundamental importância em qualquer programa de melhoramento, pois indica o controle genético do caráter importante para o estabelecimento de estratégias de seleção (RAMALHO, 2001).

2.4 Caracterização Molecular

A utilização de marcadores moleculares é uma das ferramentas de maior importância na caracterização de bancos ativos de germoplasma de diversas espécies (DANTAS; et al., 2012).

A caracterização por meio de características agronômicas e morfológicas possuem algumas restrições, como por exemplo a limitação da realização em qualquer período do ano, além de elevados custos e tempo (BIANCHI; et al., 2002). Uma alternativa é a

utilização de marcadores moleculares, ferramenta amplamente utilizada na complementação de caracterização, e que ajuda na identificação de genótipos. (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996;).

O uso de marcadores moleculares é uma opção bastante segura nos estudos genômicos, sendo uma alternativa veloz onde se busca o polimorfismo ao nível de DNA sem sofrer interferência do ambiente. Assim, fazendo com que aumente a eficiência de programas de melhoramento genético (MARTINS et al., 2011)

Um dos marcadores bastante utilizados desde 1994 é o *Inter-Simple Sequence Repeat* - ISSR (ZIETKIEWICZ et al., 1994). O marcador de Repetição de Sequência Simples entre Diferentes Loci é um marcador de técnica simples, sendo fácil sua utilização e possui um baixo custo se mostrando uma ferramenta de grande importância na análise de diversidade genética e na caracterização de acessos e cultivares de diferentes espécies. Com o uso deste marcador no gênero *Desmanthus* se obteve resultados eficientes na discriminação de genótipos (NASCIMENTO et al., 2018).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e extração de DNA

O material coletado foi proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de *Desmanthus* da Embrapa Tabuleiros Costeiros, mantidos na sede, em Aracaju, SE. (FIGURA 1). Baseado na disponibilidade de sementes, foram selecionados doze acessos contendo oito plantas (192, 179, 177, 105, 229, 180, 169, 21, 187, 160, 164, 29) e um acesso contendo sete plantas (55), de onde foram coletadas folhas jovens colocadas em sacos de papel devidamente identificados e posteriormente levadas ao laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros e armazenadas a -80°C.



FIGURA 1. Acessos de *D. leptophyllus* dispostos em estufa telada. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju.

A extração foi baseada no método descrito por (MELO, 2016) com modificações. Foi utilizada uma folha jovem de cada planta, essas folhas foram maceradas em almofariz contendo nitrogênio líquido; e após foram adicionados 800 μ L de tampão de extração (CTAB 2%, PVP 1%, 3 μ L de Proteinase K e β -mercaptoetanol) e passados para tubos de 2mL. Posteriormente foram colocados em banho maria a 65°C por 60 minutos, homogeneizando-os a cada 10 minutos durante os 30 primeiros minutos.

Após o banho maria foram adicionados 500 μ L de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) aos tubos, os quais foram homogeneizados e submetidos a centrifugação a 10.500 rpm a 20°C durante 10 minutos. 200 μ L dos sobrenadantes obtidos foram pipetados em tubos de 1,5mL contendo 200 μ L de isopropanol gelado e mantidos em freezer por um período de aproximadamente 24 horas. Logo após, o material foi centrifugado a 15.500 rpm a 20°C durante 20 minutos para a formação do precipitado, o isopropanol foi descartado e adicionado álcool 70% e submetido a centrifuga a 15.500 rpm a 20°C durante 5 minutos, essa etapa foi repetida uma vez. Após isso o álcool 70% foi descartado e adicionado álcool absoluto, e em seguida centrifugado a 10.000rpm a 20°C durante 5 minutos. Logo após o processo de limpeza foi descartada a parte líquida dos tubos e colocados os precipitados para secar. Após secos os precipitados foram ressuspensos em TE [Tris-HCl + EDTA] contendo RNase, os quais foram mantidos a 37°C por 30 minutos e em seguida armazenados em geladeira.

3.2 Quantificação, Gel eletroforese e diluição

A quantificação foi realizada utilizando NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) onde foi adicionado 2 μ L da solução do DNA extraído, em local específico do equipamento, e quantificado automaticamente (FIGURA 2).



FIGURA 2. Equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Scientific)

Além da quantificação as amostras, os DNA das amostras foram testados em gel de agarose a 1% para avaliar a integridade. Para isto adicionou-se 5 μ L de marcador de tamanho no primeiro poço de cada gel, e nos demais solução contendo 6 μ L de água ultrapura, 4 μ L da solução de DNA extraído e 2 μ L de tampão de carregamento nos demais poços. O gel foi submetido a eletroforese por 1 h e 40 min., em cuba de eletroforese horizontal (FIGURA 3).

A diluição foi feita do DNA em água ultrapura para concentração de 10ng/ μ L, utilizando dados da quantificação para definir os volumes de DNA e água ultrapura a serem utilizados.

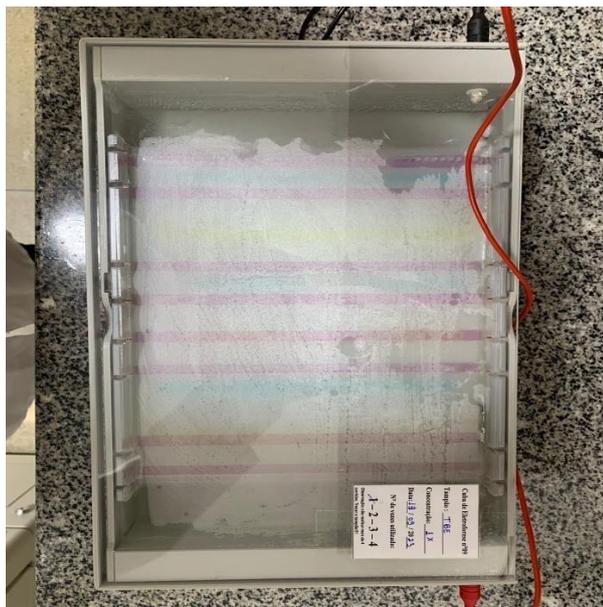


FIGURA 3. Cuba de eletroforese horizontal

3.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e fotodocumentação

Foram utilizados 6 primers que se mostraram eficazes em estudos de diversidade genética com *D. pernambucanus* (NASCIMENTO et al., 2018).

TABELA 1. Primers utilizados com suas respectivas sequências e temperatura de anelamento.

PRIMER	SEQUÊNCIA	TA (°C)
ISSR1	CAC ACA CAC ACA GG	51
ISSR2	CTC TCT CTC TCT CTC TAC	51
ISSR4	CAC ACA CAC ACA AC	51
ISSR7	CAC ACA CAC ACA GT	44
ISSR10	GAG AGA GAG AGA CC	39
ISSR14	CTC CTC CTC GC	49

Foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) contendo diferentes componentes. O DNA foi usado em uma concentração de 10 ng/ μ L na quantidade de 1 μ L por reação. O volume total da reação foi de 20 μ L, composto por 14,8 μ L de água

ultrapura, 2 μL de tampão de reação 10X, 0,6 μL de MgCl_2 , 0,4 μL de dNTP (10 nM) e 0,2 μL de Taq polimerase (5U/ μL).

A amplificação das amostras foi realizada em termociclador (FIGURA 4). O procedimento envolveu uma desnaturação inicial a 94 °C por quatro min., seguida por 40 ciclos de amplificação. Em cada ciclo, ocorreu desnaturação a 94 °C por 45 seg., anelamento por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 min. Após os ciclos, a reação foi encerrada com uma extensão final a 72 °C por 7 min, seguida de resfriamento a 10 °C.



FIGURA 4. Termociclador utilizado para amplificação do DNA

Posteriormente foi adicionado 2 μL de corante em cada amostra, centrifugado a 6000rpm em 20°C por 1 minuto e submetidos a gel eletroforese 2% utilizando uma voltagem de 184V, 92mA e 120W durante 2h e 35 min. Logos após o gel foi corado em solução de brometo de etídio por 30 minutos e fotografado utilizando o equipamento Gel doc L-pix HE (Figura 5)



Figura 5: Equipamento de fotodocumentação Hel doc L-pix HE

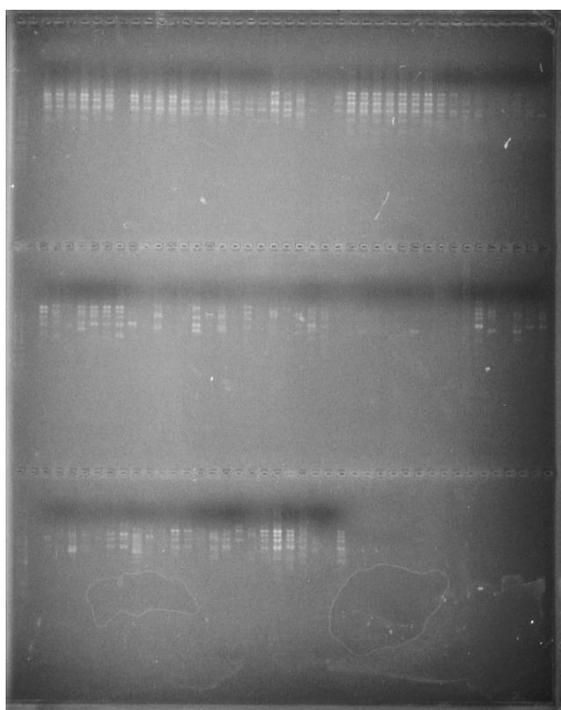


FIGURA 6. Gel fotodocumentado contendo bandas amplificadas .

3.4 Análise estatística

Através das fotos dos géis obtidos, foi montada uma matriz binária com base na ausência e presença de bandas. A matriz foi importada para o programa Genalex 6.5 e estimou-se a variabilidade genética, tendo como base o índice de Shannon (I),

heterozigidade esperada (He) e análise de variância molecular (AMOVA). Também foi realizada a estimativa de variância utilizando dendrograma.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados 6 primers, onde os estes escolhidos para avaliar a diversidade genética amplificaram 21 fragmentos. Houve uma taxa de 100% de polimorfismo em todas as linhas de bandas.

Tabela 2. Lista de primers utilizados com número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo.

Primer	N° de Bandas	N° de Bandas Polimórficas	Porcentagem de Polimorfismo (%)
ISSR1	3	3	100
ISSR2	1	1	100
ISSR4	3	3	100
ISSR7	5	5	100
ISSR10	4	4	100
ISSR14	5	5	100
TOTAL	21	21	100

O índice de Shannon (I) é um parâmetro utilizado para avaliar a diversidade genética e varia de 0 a 1, onde 0 é o menor grau de variabilidade genética e 1 é o máximo de variabilidade genética (GIUSTINA et al., 2014). O índice de Shannon encontrado no estudo foi 0,369, semelhante ao encontrado em estudo com acessos de *Desmanthus* spp. onde o índice foi de 0,361e considerado moderado a baixo (COSTA et al., 2017). Outro parâmetro utilizado para analisar a diversidade genética é a heterozigidade esperada (He) onde obteve-se uma média de 0,263 considerada baixa. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com *Desmanthus virgatus* utilizando marcadores RAPD com a He média de 0,38 indicando baixa variabilidade (SOARES et al., 2020)

Tabela 3. Diversidade genética estimada pelo Índice de Shannon (I), heterozigidade esperada (He) e heterozigidade esperada ajustada (uHE) para acessos de *Desmanthus*

leptophyllus avaliados com primers ISSR.

Acesso	Índice de Shannon (I)	Heterozigosidade esperada (He)	Heterozigosidade esperada ajustada (uHE)
	I	He	uHe
192	0,435	0,295	0,315
279	0,431	0,295	0,315
55	0,443	0,304	0,328
177	0,313	0,215	0,229
105	0,446	0,300	0,320
229	0,514	0,352	0,376
180	0,437	0,290	0,309
169	0,363	0,241	0,257
21	0,164	0,094	0,100
187	0,319	0,203	0,216
160	0,274	0,179	0,191
164	0,291	0,191	0,203
29	0,367	0,250	0,266
Média	0,369	0,247	0,263

Esses resultados podem estar ligados ao método de reprodução da espécie, que pode influenciar na diversidade genética (SOARES et al., 2016). Por ser autógama o processo de troca de material genético é dificultado, explicando a baixa diversidade (SOARES et al., 2020).

A variância molecular foi analisada por AMOVA (Análise Molecular da Variância), e os resultados revelaram 27% de variância entre os acessos e 73% dentro dos acessos. Em estudos com *Stylosanthes* spp., uma leguminosa na qual também predomina a autogamia, foram encontrados resultados divergentes onde a variância entre as populações foi maior que a variância dentro das populações (COSTA, 2017).

TABELA 4. Análise de variância molecular (AMOVA) de 103 indivíduos representando 13 acessos de *Desmanthus leptophyllus* avaliados com primers ISSR.

Aracaju, SE

Fonte de variação	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre	12	150.723	12.560	1.184	27%
Dentro	90	286.054	3.178	3.178	73%
Total	102	436,777		4,363	100%

As estimativas de diversidade genética, avaliadas através do método UPGMA (Figura 6), constataram a formação de dois grandes grupos distintos e a existência de algumas duplicatas. A existência de um pequeno número de grupos pode sugerir uma limitada diversidade genética, a qual pode estar relacionada à escassez de variação genética na espécie (FONTENELE et al., 2009)

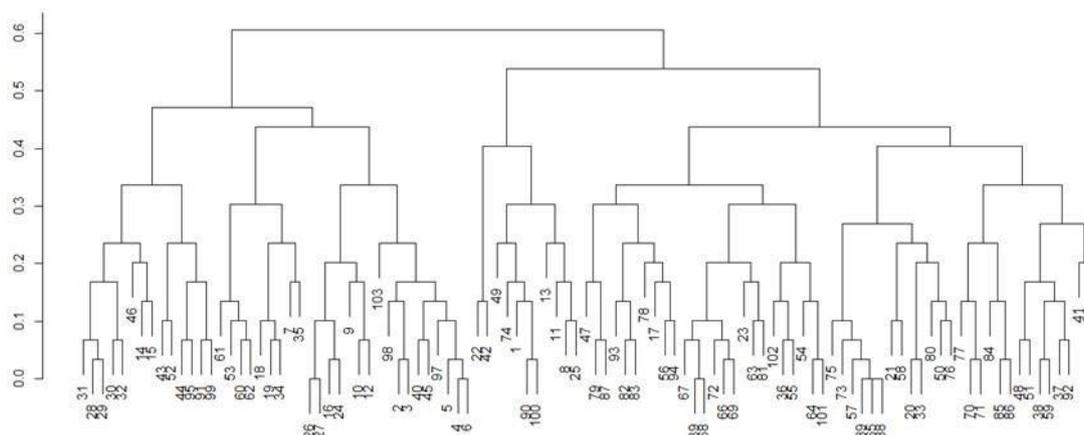


FIGURA 7. Dendrograma de similaridade entre 103 indivíduos representando 13 acessos de *Desmanthus leptophyllus* avaliados com primers ISSR.

5. CONCLUSÃO

Acessos de *Desmanthus leptophyllus* do Banco de Germoplasma de *Desmanthus* da Embrapa Tabuleiros Costeiro, apresentam diversidade genética classificada de moderada a baixa. A taxa de variação genética dentro dos acessos foi maior do que a variação entre os acessos. Sugere-se que alguns pares de genótipos sejam duplicatas

Os marcadores moleculares ISSR utilizados no estudo, são importantes para estimar a variabilidade genética de *Desmanthus leptophyllus*.

6. REFERÊNCIAS

Araujo, G. G. L. As forrageiras nativas como base da sustentabilidade da pecuária no semiárido. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2015.

ARRIEL, N. H. C. et al. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1285-1290, 2006.

AZEVEDO, V. C. R. **Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Caracterização molecular**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2010.

BIANCHI, V. J.; VENTURI, S.; FACHINELLO, J. C.; TARTARINI, S.; SANSAVINI, S. I marcatori AFLP e SSR, rivolutivi nella identificazione genética delle varietà di susino. **Rivista di Frutticoltura**, Bologna, 2002.

CALADO, T.B.; CUNHA, M.V.; TEIXEIRA, V.B.; SANTOS, M.V.F.; CAVALCANTI, H.S.; LIRA, C.C. Morphology and productivity of “jureminha” genotypes (*Desmanthus* spp.) under different cutting intensities. **Revista Caatinga**, 2016.

DE CALDAS PINTO, Maria do Socorro; CAVALCANTE, Maria Andréa Borges; DE ANDRADE, Maria Verônica Meira. Potencial forrageiro da caatinga, fenologia, métodos de avaliação da área foliar e o efeito do déficit hídrico sobre o crescimento de plantas. **REDVET. Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 7, n. 4, p. 1-11, 2006.

COSTA, F. G. P. et al. Utilização do feno de jureminha (*Desmanthus virgatus*) na alimentação de frangos caipiras. **Agropecuária Técnica**, v. 29, n. 1-2, p. 11-16, 2008.

COSTA, José Carlos da et al. **Diversidade de *Desmanthus* spp. e *Stylosanthes* spp. do semiárido pernambucano**. 2017.

DANTAS, Ana Carolina de Assis et al. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 183-189, 2012.

DAUFRESNE, Martin; RENAULT, Olivier. Population fluctuations, regulation and limitation in stream-living brown trout. **Oikos**, v. 113, n. 3, p. 459-468, 2006.

DOYLE, Jeffrey. DNA protocols for plants. **In: Molecular techniques in taxonomy**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1991. p. 283-293.

FALEIRO, F. G. et al. **Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares-fase 3: resultados de pesquisa e desenvolvimento 2012-2016.** 2017.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 1996.

FONTENELE, Ana Consuelo Ferreira et al. Leguminosas tropicais: *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. uma forrageira promissora. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 15, n. 1-4, 2009.

HASHIMOTO-FREITAS, D. Y.; NASSAR, N. M. A. Cytogenetic and anatomic behavior of cytochimeras and total polyploids in cassava. **Genet. Mol. Res**, v. 12, p. 4879-4894, 2013.

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

GIULIETTI, Ana Maria et al. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga.** Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação, 2004.

GIUSTINA, L. D. et al. Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). **Genetics and molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3510-3519, 2014.

JONES, R. M.; BRANDON, N. J. Persistence and productivity of eight accessions of *Desmanthus virgatus* under a range of grazing pressures in subtropical Queensland. **Tropical Grasslands**, v. 32, p. 145-152, 1998.

LIRA, Irlane Cristine de Souza Andrade et al. **Caracterização citogenética e morfoagronômica de acesso de *Stylosanthes* spp.(Fabaceae–Papilionoideae) coletados no Nordeste brasileiro.** 2015.

LOIOLA, Maria Iracema Bezerra et al. Leguminosas e seu potencial de uso em comunidades rurais de São Miguel do Gostoso–RN. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 3, p. 59-70, 2010.

LUCKOW, Melissa. Monograph of *Desmanthus* (leguminosae-mimosoideae). **Systematic Botany Monographs**, p. 1-166, 1993.

MARTINS, Antonio Baldo Geraldo et al. Caracterização molecular e diversidade genética de diferentes variedades de abacate por marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 1178-1184, 2011.

DA SILVA MATOS, Natália Christina et al. Produção sustentável de alimentos e educação: uma relação essencial. **Educação Ambiental em Ação**, v. 17, n. 65, 2018.

MEDEIROS, Carlos AB et al. Fome zero e agricultura sustentável: contribuições da Embrapa. 2018.

MUIR, James P. et al. Challenges to domesticating native forage legumes. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 2, n. 1, p. 94-96, 2014.

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. 93-101, 2001.

RANGEL, José Henrique de Albuquerque. Agroecological studies of *Desmanthus*: a tropical forage legume. 2005. Tese de Doutorado. James Cook University.

DE ALBUQUERQUE RANGEL, José Henrique; GARDINER, Christopher Peter; BURT, Robert Lewis. Dormancy releasing mechanisms in soil seed banks of *Desmanthus* genotypes. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 1, p. 90-99, 2015.

REID, C. P. P.; KIDD, F. A.; EKWEBELAM, S. A. Nitrogen nutrition, photosynthesis and carbon allocation in ectomycorrhizal pine. **Tree root systems and their mycorrhizas**, p. 415-431, 1983.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia**, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.

JARAMILLO, Sildana; BAENA, Margarita. **Manual de apoio à formação e treino em conservação ex situ de recursos fitogenéticos**. 2003.

DA SILVA, Ana Veruska Cruz et al. Intercâmbio de germoplasma e diversidade genética para enriquecimento do bag *Desmanthus*. **Revista Caatinga**, v. 36, n. 1, p. 33-40, 2023.

SOARES, A. N. R. et al. Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. **Genet. Mol. Res**, v. 15, n. 3, p. 1503-8624, 2016.

SOARES, Tássia Fernanda Santos Neri et al. ***Moringa oleifera* Genebank in Brazil: current status and future approaches**. 2023.

TEMPLETON, Alan Robert. Genética de populações e teoria microevolutiva. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, 2011.

ZIETKIEWICZ, Ewa; RAFALSKI, Antoni; LABUDA, Damian. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.