

***José Carlos da Costa***

**Diversidade de *Desmanthus* spp. e *Stylosanthes* spp. do semiárido pernambucano**

**Recife  
2017**

**José Carlos da Costa**

**Diversidade de *Desmanthus* spp. e *Stylosanthes* spp. do semiárido pernambucano**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia “Melhoramento Genético de Plantas”, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Agronomia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Professor Dr. Mario de Andrade Lira Junior – Orientador – UFRPE

Professora Dra. Mércia Virginia Ferreira dos Santos – Co-orientadora – UFRPE

Professora Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto – Co-orientadora – UFRPE

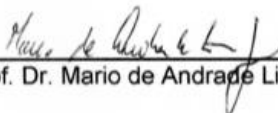
**Recife  
2017**

**Diversidade de *Desmanthus* spp. e *Stylosanthes* spp. do semiárido pernambucano**

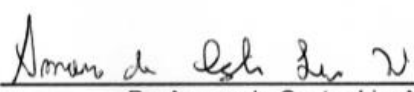
**JOSÉ CARLOS DA COSTA**

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 06/07/2017

**ORIENTADOR:**

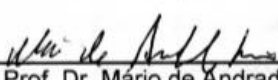
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior - UFRPE/DEPA

**EXAMINADORES:**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Amaro de Castro Lira Neto – IPA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Prof. Ederson Akio Kido - UFPE/Dep. Genética

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva - UFRPE/DB

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mario de Andrade Lira – UFRPE/DZ

**Recife  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C837d Costa, José Carlos da.  
Diversidade de *Desmanthus* spp. e *Stylosanthes* spp. do semiárido  
Pernambuco / José Carlos da Costa. – 2017.  
117 f. : il.

Orientador: Mário de Andrade Lira Júnior.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético  
de Plantas, Recife, BR-PE, 2017.  
Inclui referências, anexos e apêndices.

1. Forragem 2. Leguminosas nativas 3. Variabilidade genética  
4. Melhoramento genético de plantas I. Lira Junior, Mário de Andrade  
orient. II. Título

CDD 581.15

A Deus

**OFEREÇO**

À minha mãe, Maria José, e ao meu filho Carlos Arthur que apesar de estarem no céu, sempre os levo comigo.

**DEDICO**

*A humildade é a única base  
sólida de todas as virtudes*

**Confúcio**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fortaleza em todos os momentos.

Aos meus pais que se dedicaram na educação e incentivos em todos os instantes.

À minha esposa, Emyliane, por tudo que representa para mim e pela grande companheira que é, mesmo nos momentos de tensão ao logo desta tese.

Aos meus irmãos Severino, Simone e Carla por serem tão especiais.

Ao Prof. Dr. Mário de Andrade Lira Junior, por ter aceito orientar minha tese, e por ter compreendido as minhas limitações, oferecendo-me o espaço necessário para que essas fossem superadas.

Às Prof<sup>as</sup>. Dr<sup>as</sup> Mércia Virginia Ferreira dos Santos e Giselle Gomes Monteiro Fracetto, pela co-orientação, presença constante e grandes contribuições durante todo o curso.

Ao amigo Dr. Toni Carvalho, grande companheiro nas coletas, pela sua ajuda e atenção no experimento de campo.

Ao Dr. Felipe Curry, pela colaboração no laboratório de microbiologia e tradução do artigo para o Inglês.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Vanusa, por permitir a utilização do laboratório de bioquímica da UFPE.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angélica Valóis, pela compreensão durante o período que usei o laboratório de biotecnologia.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Vilela Resende, pela orientação no período de graduação.

Às Prof<sup>as</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabel Galindo e Dr<sup>a</sup>. Rosimar Musser, minhas queridas tutoras do Programa de Educação Tutorial-PET.

Ao engenheiro agrônomo Fernando Galindo, pela colaboração na identificação das espécies.

À pesquisadora Leila Costa da Embrapa, pela troca de experiência na formação de conceitos na área de botânica.

Aos amigos de turma: Adônis Mendes, Paula Pinheiro, Marta, Diogo, Ismael, Rodolfo, Cleyton e Ana pela ajuda e companheirismo durante essa jornada.

Aos estagiários Vitor, Joais e ao amigo Gêneses, pelo grande apoio na extração dos DNAs.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Melhoramento Genético de Plantas, pelas contribuições e ensinamentos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade e formação acadêmica.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA, pelo uso do herbário.

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia-IFPE, Campus Vitória de Santo Antão, pelo apoio financeiro e liberação das atividades docentes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, pelo custeio dos experimentos através do projeto de pesquisa.

Ao programa PRODOUTORAL/CAPES, pela concessão da bolsa.

E a todos que diretamente e indiretamente contribuíram no desenvolvimento e conclusão desta tese.

Muito obrigado!



## LISTA DE FIGURAS

<b>Capítulo II</b>	<b>Páginas</b>
<b>Genetic diversity of <i>Desmanthus</i> sp. accessions using ISSR markers and morphological traits</b>	
<b>Figura 1</b> Morphological dissimilarity dendrogram of 16 <i>Desmanthus</i> sp. accessions belonging to the germplasm bank from Universidade Federal Rural de Pernambuco- Academic Unit of Serra Talhada – PE.....	58
<b>Figura 2</b> ISSR Dendrogram dissimilarity of 22 <i>Desmanthus</i> sp accessions belonging to the germplasm bank from Universidade Federal Rural de Pernambuco - Academic Unit of Serra Talhada - PE.....	58
<b>Figura 3</b> Agarose gels showing the electrophoretic profiles of the inter-simple sequence repeat markers amplified using the primer 810 in 22 <i>Desmathus</i> sp. plants.	59
<b>Capítulo III</b>	
<b>Características morfológicas e informações ambientais de <i>Stylosanthes</i> spp. com ocorrência natural em Pernambuco</b>	
<b>Figura 1</b> Dendrograma gerado pelo método UPGMA usando a distância de Mahalanobis entre <i>Stylosanthes</i> spp. coletadas no estado de Pernambuco.....	78
<b>Capítulo IV</b>	
<b>Diversidade genéticas em populações naturais de <i>Stylosanthes scabra</i> usando marcadores ISSR</b>	
<b>Figura 1</b> Locais de coleta de populações de <i>Stylosanthes scabra</i> no estado de Pernambuco.....	97
<b>Figura 2</b> Géis mostrando os perfis eletroforéticos dos marcadores ISSR	98
<b>Figura 3</b> Número de bandas privadas por primers em populações de <i>S. scabra</i> de Pernambuco.	99
<b>Figura 4</b> Análises molecular da variância (AMOVA).....	99
<b>Figura 5</b> Representação dos 76 indivíduos de quatro populações naturais de <i>S. scabra</i> segundo dados moleculares com ISSRs utilizando o programa “Structure”.....	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Capítulo II</b>	<b>Páginas</b>
<b>Genetic diversity of <i>Desmanthus</i> sp. accessions using ISSR markers and morphological traits</b>	
<b>Tabela 1</b> <i>Desmanthus</i> sp accessions and their respective access numbers, collection city, soil type, latitude, longitude and altitude.....	46
<b>Tabela 2</b> ISSR primers selected for <i>Desmanthus</i> sp genotypes, sequence, total fragment number per primer, polymorphism percentage (LP), alleles number (Na), effective alleles number (Ne), Shannon index (I) and Nei genetic diversity (He) .....	47
<b>Tabela 3</b> Relative importance of eighth descriptors for genetic divergence in <i>Desmanthus</i> spp.....	49
<b>Tabela 4</b> Matrix generated based on the Jaccard's similarity coefficient of 22 <i>Desmanthus</i> sp. plants.....	51
 <b>Capítulo III</b>	
<b>Características morfológicas e informações ambientais de <i>Stylosanthes</i> spp. com ocorrência natural em Pernambuco</b>	
<b>Tabela 1</b> Lista de espécies de <i>Stylosanthes</i> coletados no estado de Pernambuco e dados ambientais.....	65
<b>Tabela 2</b> Características dos ambientes de coleta, parâmetros genéticos associados às características morfológicas de <i>Stylosanthes</i> spp. coletadas no estado de Pernambuco .....	69
<b>Tabela 3</b> Estimativa de correlações de Pearson entre caracteres morfológicos em diferentes espécies de <i>Stylosanthes</i> coletados no estado de Pernambuco.....	72
<b>Tabela 4</b> Estimativa de correlações de Pearson entre caracteres morfológicos e características climáticas do local de coleta para diferentes espécies de <i>Stylosanthes</i> em Pernambuco.....	73
 <b>Capítulo IV</b>	
<b>Diversidade genéticas em populações naturais de <i>Stylosanthes scabra</i> usando marcadores ISSR</b>	
<b>Tabela 1</b> Identificação de populações de <i>Stylosanthes scabra</i> estudadas no estado de Pernambuco .....	84

<b>Tabela 2</b>	Oligonucleotídeos de ISSR selecionados para genótipos de <i>Stylosanthes scabra</i> .....	86
<b>Tabela 3</b>	Parâmetros de diferenciação genética entre quatro populações de <i>S. scabra</i> .....	87
<b>Tabela 4</b>	Similaridade genética e Dissimilaridade genética para quatro populações de <i>S. scabra</i> em Pernambuco.....	88

## SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>OBJETIVOS</b> .....	16
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	
1.1. Importância de Leguminosas forrageiras.....	18
1.1.1. <i>Stylosanthes</i> .....	20
1.1.2. <i>Desmanthus</i> .....	21
1.2. Diversidade genética.....	22
1.2.1. Avaliação fenotípica.....	24
1.2.2. Caracterização molecular.....	25
1.3. Melhoramento de leguminosas forrageiras no Brasil.....	26
1.4. Referências.....	29
<b>CAPÍTULO II</b>	
Genetic diversity of <i>Desmanthus</i> sp. accessions using ISSR markers and morphological traits	
Abstract .....	43
Introduction.....	44
Material and Methods.....	45
Results and discussion.....	46

References.....	53
-----------------	----

### CAPÍTULO III

#### Características morfológicas, parâmetros genéticos e informações climáticas para *Stylosanthes* spp. coletados em Pernambuco, Brasil

Resumo.....	61
Abstract .....	62
Introdução.....	63
Material e Métodos .....	64
Resultados e discussão.....	67
Conclusões.....	74
Referências.....	74

### CAPÍTULO IV

#### Diversidade genéticas em populações naturais de *Stylosanthes scabra* usando marcadores ISSR

Resumo.....	80
Abstract .....	81
Introdução.....	82
Material e Métodos .....	84
Resultados e discussão.....	86
Conclusões.....	90
Referências.....	91

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
-------------------------	-----

6. APÊNDICES.....	102
-------------------	-----

7. ANEXOS	108
-----------	-----

7.1. Normas da revista CBB.....	109
---------------------------------	-----

7.2. Normas da revista GMR.....	112
---------------------------------	-----

## RESUMO

### **Diversidade de *Desmanthus* spp. e *Stylosanthes* spp. do semiárido pernambucano**

Os gêneros *Desmanthus* e *Stylosanthes* são compostos por leguminosas nativas do semiárido e que apresentam potencial para forragem, pelo valor nutricional, rusticidade e simbiose para fixação biológica de Nitrogênio. Esses gêneros ocorrem de forma espontânea na região semiárida de Pernambuco. Desta forma, conhecer a variabilidade dessas plantas forrageiras é essencial para que tais informações sejam utilizadas como base para pesquisas futuras, contribuindo com a utilização dos recursos genéticos disponíveis no melhoramento genético. Assim, objetivou-se avaliar a diversidade genética e morfológica de algumas espécies dos gêneros *Stylosanthes* e *Desmanthus* com ocorrência natural no semiárido de Pernambuco. Para o gênero *Stylosanthes*, foram realizadas coletas no semiárido de Pernambuco no mês de setembro de 2015. As plantas foram identificadas quanto suas espécies no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA. Os acessos foram propagados via sementes e cultivadas entre os meses de Novembro de 2015 a Abril de 2016 em telado do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco no Campus de Dois Irmãos, em Recife, Pernambuco. Para identificar a diversidade de populações de *Stylosanthes scabra* por meio de marcadores ISSR, foram coletadas folhas de 76 plantas pertencentes a quatro populações localizadas nos municípios de Santa Cruz do Capibaribe, Caetés, Sertânia e Petrolina. Com o gênero *Desmanthus*, foi realizada a caracterização morfológica em 18 acessos e caracterização molecular por marcadores ISSR em 26 acessos. Todos acessos de *Desmanthus* que foram utilizados na caracterização pertencem ao banco de germoplasma de leguminosas forrageiras da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE na

Unidade Acadêmica de Serra Talhada-PE implantado em 2012. Constatou-se a existência de variabilidade nos dois gêneros, no entanto, para o gênero *Stylosanthes* foi confirmado sete espécies. A espécie *S. scabra* se destacou por maior produção de massa seca de folhas com 6,10g. No gênero *Desmanthus*, os acessos 235C e 22SA foram os mais divergentes e se apresentam isolados dentro dos seus grupos, tanto nas análises morfológicas quanto moleculares. Considerando as populações de *S. scabra*, observou-se maior variabilidade entre populações (60%) do que dentro das populações (40%). As altas variabilidades morfológicas e genéticas dos acessos, tanto em *Desmanthus* quanto em *Stylosanthes*, evidenciam a importância da coleção para futuros trabalhos de melhoramento genético.

**Palavras-chave:** Forragem, Leguminosas nativas, Variabilidade genética.

## ABSTRACT

### **Diversity of *Desmanthus* spp. and *Stylosanthes* spp. from semiarid Pernambucano**

The *Desmanthus* and *Stylosanthes* genus are legumes of the semi-arid, It has great potential for Forage Crops for its nutritional value, hardiness and symbiosis for nitrogen fixation. These genera spontaneously in the sown region of Pernambuco. Thus, knowing the variability of these forage plants is essential for such information to be used as a basis for future research, contributing to the utilization of genetic resources available in genetic improvement. This study had as objective measure the genetic and morphological diversity in *Desmanthus* and *Stylosanthes* genus with naturally occurring in Pernambuco. For *Stylosanthes*, collections were made in the semi-arid region of Pernambuco in September 2015. The species plants were identified in the herbarium of the

Instituto Agronômico de Pernambuco-IPA. The accesses were propagated via seeds and cultivated between November 2015 and April 2016 in the Department of Animal Science of the Federal Rural University of Pernambuco at the Dois Irmãos Campus in Recife, Pernambuco. To identify the diversity of *Stylosanthes scabra* populations, 76 plants were collected from four populations located in the municipalities of Santa Cruz do Capibaribe, Caetés, Sertânia and Petrolina. With the genus *Desmanthus*, the morphological characterization was performed in 18 accesses and molecular characterization by ISSR marker in 26 accessions. All accesses of *Desmanthus* belonging to the germplasm bank of forage legumes of the Federal Rural University of Pernambuco- UFRPE in the Academic Unit of Serra Talhada-PE implemented in 2012. There is variability in the two genus, however, the *Stylosanthes* presents greater variability. It was verified the presence of quite contrasting species. *S. scabra* and *S. seabrana* were distinguished by higher production of dry leaf mass. In the genus *Desmanthus*, accesses 235C and 22SA deserve special attention because they are isolated within their groups in both morphological and molecular analyzes and are indicated to be used in breeding programs of the species. Considering the populations of *S. scabra*. The species presents greater variability among populations (60%) than within populations (40%). The high morphological and genetic variability of the accesses evidences the importance of the collection for future works of genetic improvement.

**Keywords:** Forage, Native legumes, Genetic variability.

## INTRODUÇÃO

No nordeste brasileiro existe uma grande diversidade de leguminosas nativas e a região é considerada um importante centro de origem de leguminosas, entre elas, aquelas dos gêneros *Desmanthus* e *Stylosanthes* (Loiola et al. 2010). Essas leguminosas são plantas tolerantes a solos ácidos e de baixa fertilidade, com alta capacidade de fixação biológica do nitrogênio e tolerantes a seca e adaptadas aos solos da região (Casa Grande et al. 2013). A utilização de leguminosas forrageiras apresenta-se como uma excelente alternativa alimentar proteica de baixo custo para as regiões do semiárido brasileiro (Santana Neto et al. 2015).

*Stylosanthes* apresenta grande distribuição em todo mundo. Possui cerca de 50 espécies descritas, das quais 25 espécies são encontradas em território brasileiro (Lewis et al. 2005; Costa 2008). É originário da América Central e do Sul, mas, em virtude de sua importância econômica, também é encontrado em banco de germoplasma na Austrália (Stace e Edye 1984). A maioria das espécies são perenes, com sistema radicular bem desenvolvido, tolerante à seca e de grande capacidade colonizadora por sua adaptação a solos de baixa fertilidade (Negreiros et al. 2010) e simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, podendo fixar 150 kg N/ha/ano (Ribeiro et al. 2011).

O gênero *Desmanthus* é composto por 24 espécies com ocorrência natural registrada em regiões tropicais e subtropicais das Américas (Muir et al. 2014). Possui hábito de crescimento arbustivo e destaca-se pela rusticidade e persistência, podendo ser utilizada para formação de banco de proteínas, ou em consórcio com gramíneas (Figueiredo et al. 2000), fixando até 97 kg N/ha/ano (Diniz Neto et al. 2013). São plantas que conseguem ter altos teores de proteínas com baixo teor de tanino, em folhas de *Desmanthus virgatus* o tanino representa apenas 2,4% (Silva e Medeiros 2003). Em Pernambuco, expedições de coletas foram realizadas em 11 municípios (Queiroz 2012), sendo os acessos introduzidos no banco de germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE.

O banco de germoplasma da UFRPE iniciou com exemplares de *Desmanthus* spp. e *Stylosanthes* spp. provenientes de 11 municípios do Semiárido de Pernambuco cultivados na unidade acadêmica de Serra talhada



(Queiroz, 2012). Para realizar avaliações morfológicas e nutritivas dos acessos, um novo banco foi inserido na Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina, da UFRPE, no Município de Carpina – PE (Diniz, 2016). Essa nova coleção recebeu sementes dos acessos que já estavam estabelecidos em Serra Talhada e tem sido implementado com novos acessos resultantes de coletas recentes.

A avaliação da diversidade genética entre os acessos de um banco de germoplasma resulta em informações de potenciais genitores a serem utilizados em programas de melhoramento, possibilita a identificação de duplicatas e o intercâmbio de germoplasma entre pesquisadores (Bertan 2009). Para se obter sucesso na caracterização de plantas por meio de marcadores morfológicos deve-se utilizar marcadores estáveis, com alta herdabilidade e com fácil mensuração (Valls 2007). Os marcadores morfológicos ainda são muito utilizados, no entanto, podem apresentar problemas de baixa eficiência no diagnóstico de avaliação da variabilidade disponível (Oliveira et al. 2016; Silva et al. 2013).

Já os marcadores moleculares avaliam o genoma, evitando o efeito ambiental e conseqüentemente possíveis erros de identificação (Mendes et al. 2010). O potencial de uso dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas é bastante amplo, destacando-se a identificação e discriminação de genótipos, quantificação da variabilidade genética ao nível de sequências de nucleotídeos no DNA (Bertan et al. 2009; Kumar et al. 2017), quantificação da variabilidade genética, identificação de origem parental, determinação de formas de reprodução e monitoramento de cruzamentos (Silva et al. 2014).

A utilização de marcadores moleculares no melhoramento, tanto para o gênero *Stylosanthes* quanto para outras espécies de forrageiras, tem sido cada dia mais frequentes (Santos-Garcia et al. 2012). Entre inúmeras técnicas utilizadas, pode-se destacar *Inter-Simple Sequence Repeat* - ISSR que vem sendo empregada para a diferenciação rápida entre indivíduos aparentados, devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo (Araújo et al. 2016; Santos 2014). Assim, é necessário conhecer a variabilidade

genética existente no semiárido de Pernambuco e na coleção da Universidade Federal Rural de Pernambuco -UFRPE.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos gerais**

Avaliar a diversidade genética e morfológica de algumas espécies dos gêneros *Stylosanthes* e *Desmanthus* com ocorrência natural no semiárido de Pernambuco.

### **Objetivos específicos**

Realizar a caracterização morfológica de algumas espécies de *Stylosanthes* coletadas no semiárido de Pernambuco;

Avaliar a estrutura genética entre quatro populações de *Stylosanthes scabra* coletadas no semiárido e as interações genéticas entre essas;

Estimar a diversidade morfológica e molecular em acessos do gênero *Desmanthus* da coleção da UFRPE implantados em Serra Talhada.

## CAPÍTULO I

---

### REFERENCIAL TEÓRICO

## **1. Referencial teórico**

### **1.1. Importância de leguminosas forrageiras**

Na estação seca do Nordeste, período em que as pastagens se apresentam com baixos valores nutritivos, a produção animal é dificultada pela falta de alimento, não suportando a lotação animal que é imposta (Karia 2008). Por esse motivo, é importante estudar espécies que se adequem a sistemas de produção adaptados a região e que forneçam alimentos durante um período de estiagem mais prolongado, diminuindo os problemas com a falta de forragem no período seco (Dantas et al. 2008).

Arranjos produtivos locais tem sido estudados com o objetivo de diminuir ou eliminar o déficit de alimento para os animais, em determinadas épocas do ano para as condições do semiárido (Benicio 2015). Assim a utilização de leguminosas nativas apresenta-se como uma importante alternativa (Santana Neto et al. 2015).

O cultivo de leguminosas forrageiras proporciona grandes benefícios ao sistema de produção, pois contribui com a diversificação das pastagens e possibilita o cultivo mesmo em solos mais pobres (Gama 2013). As leguminosas possuem elevados teores de proteínas e são consumidas pelos ruminantes, o que eleva o padrão da dieta dos animais (Monteiro et al. 2009).

Segundo Lopes et al. (2011), as maiores contribuições das leguminosas forrageiras são seu potencial de incorporar Nitrogênio ao solo e disponibilizar às pastagens, possibilitando a redução de fertilizantes nitrogenados e elevando o potencial produtivo. As leguminosas também podem aumentar o carbono orgânico do solo e suprimir o crescimento de plantas daninhas (Warwick et al. 2016). A utilidade dessas plantas é ampla, há registros que podem até reduzir a acidificação das águas subterrâneas, diminuindo o impacto de monocultivos (Ashworth et al. 2014).

No entanto, a introdução de leguminosas em pastagens apresenta uma série de dificuldades, dentre as quais podem ser citados custo de aquisição de sementes, baixa persistência, manejos específicos e adubação inadequadas. A baixa persistência também se deve as leguminosas tropicais, de uma maneira

geral, serem mais sensíveis que as gramíneas ao pastejo. Quando são utilizadas em sistemas consorciados, normalmente os animais exercem maior preferência por algumas leguminosas, contribuindo para a baixa proporção destas na pastagem (Almeida et al. 2015).

A adoção de leguminosas nativas em pastagens ainda é muito baixa, tendo em vista seu grande potencial. Embora tenha havido algum progresso, o custo de sementes das variedades mais bem-sucedidas limita o uso extensivo. Mais pesquisas e marketing são necessários para que leguminosas nativas contribuam para pastagens naturais e cultivadas de forma produtiva e sustentável. Uma indústria de sementes comercialmente viável para apoiar o uso de leguminosas nativas exigirá genótipos amplamente adaptados, geneticamente diversos e superiores, em vez de apenas ecótipos locais (Muir et al. 2014). Entre as leguminosas promissoras estão as dos gêneros *Desmanthus* e *Stylosanthes*.

O gênero *Desmanthus* apresenta ocorrência natural na região semiárida (Pengelly e Liu 2001). Pode ser utilizada como alternativa para alimentação de bovinos, caprinos e ovinos nos períodos secos no semiárido brasileiro, em consórcio com gramíneas, em banco de proteínas (legumineiras), para silagens ou em consórcio com outras culturas agrícolas (Araújo et al. 2003). *D. pernambucanus* L. Thell pode fixar 97,54 kg de N/ha/ano (Diniz 2016).

Por sua vez, o gênero *Stylosanthes* chama atenção devido ao número de espécies com potencial de forragem, com excelente qualidade nutricional e sua fácil adaptação a diferentes condições ambientais (Calles eSchultze-Kraft 2016). Além da capacidade produtiva, *Stylosanthes* é citado por sua capacidade de restaurar a fertilidade do solo (Fabrice 2015), melhorar as propriedades físicas do solo e fornecer cobertura vegetal (Negreiros et al. 2010). Ribeiro et al. (2011), em estudo do efeito do capim-tanzânia adubado ou consorciado com *S. macrocephala* e *S. capitata*, observaram que o uso da leguminosa em consórcio proporcionou produção de forragem semelhante a pastagens cultivadas solteiras e adubadas com 150 kg N/ha/ano.

### 1.1.1. *Stylosanthes*

O gênero *Stylosanthes* é bastante complexo taxonomicamente, sendo composto por 50 espécies, com 25 delas de ocorrência no Brasil (Santos-Garcia 2011). O gênero é dividido em duas seções, baseadas na presença/ausência de eixo plumoso na base de flores e/ou frutos e no número de bractéolas. *Stylosanthes* seção *Stylosanthes* é caracterizada por apresentar eixo rudimentar na base e três bractéolas; entre as espécies dessa seção estão *S. macrocephala*, *S. hamata* e *S. scabra*. Já *Stylosanthes* seção *Stylosanthes* não possui eixo rudimentar na base das flores e frutos e apresenta duas bractéolas, como *S. humilis*, *S. angustifolia*, *S. guianensis* entre outras (Costa et al. 2008).

Plantas com folhas formadas por 3 folíolos, com estípulas presentes em sua base são características marcantes de *Stylosanthes* spp. O caule é altamente variável, indo de glabros, puberulentos ciliados a densamente pilosos-setosos. A inflorescência é penducunlada, formada por uma ou por mais espigas. O fruto é um lomento com dois artículos. Os folíolos apresentam coloração de verde escuro a vermelho claro, algumas partes da planta apresentam pelos, outras tricomas com certa viscosidade (Costa 2006).

Levantamentos para ocorrência desse gênero no semiárido Nordeste determinaram a ocorrência de 4 espécies (*S. capitata* Vogel, *S. humilis* Kunth, *S. scabra* Vogel e *S. viscosa* (L.) W.), revelando grande diversidade em diferentes locais, e mostrando que existe muita variabilidade no gênero a ser explorada (Karia 2008; Oliveira 2015). A distinção das espécies dentro do gênero tem sido realizada baseada predominantemente em caracteres morfológicos. Dentre os estudos taxonômicos realizados com *Stylosanthes* no Brasil, destacam-se os de Brandão e Costa (1979), Costa et al. (2008) e Medeiros e Flores (2014).

Nove das espécies de *Stylosanthes* têm importância econômica, *Stylosanthes capitata* Vogel., *S. fruticosa* (Retz.) Alston, *S. guianensis* (Aubl.) Sw., *S. hamata* (L.) Taub., *S. humilis* Kunth, *S. macrocephala* MB Ferreira and Sousa Costa, *S. scabra* Vogel, *S. seabrana* Maass and 't Manneetje e *S. viscosa* (L.) Sw. (Calles and Schultze-Kraft 2016, Vanni e Fernandes 2011).

A maioria das espécies de *Stylosanthes* é autógama, porém pode apresentar taxas de fecundação cruzada variável para cada espécie (Vieira et al. 2007). O número de cromossomos também é bem variável,  $2n=40$  (*S. scabra*) e  $2n=20$  (*S. seabrana*) cromossomos (Andrade Lira 2015). Vanni and Fernandez (2011) relataram a existência de diploides e tetraploides em uma mesma amostra de sementes comerciais de *S. seabrana* cv. Única. Já *S. guianensis* é diplóide  $2n=20$  e predominantemente autógama, mas com taxa de 18 % de fecundação cruzada (Wul et al. 2015).

### 1.1.2. *Desmanthus*

O gênero ocorre em regiões tropicais e subtropicais das Américas. Possui ocorrência em grande parte do país, com destaque aos Estados da Bahia, Maranhão, Paraíba, Pernambuco e Piauí (Queiroz 2009; Queiroz 2012). As espécies deste gênero apresentam plantas robustas com muitas ramificações em sua base. Possuem raízes profundas e tem grande adaptação a regiões com déficit hídrico (Diniz Neto et al. 2013).

Dentre as espécies do gênero, *Desmanthus pernambucanus* tem origem na América do Sul, provavelmente no Nordeste do Brasil (Pengelly e Liu 2001). Apresenta flores amarelas, com folhas bipinadas e raízes penetrantes, resistentes e duras com presença de xilópódios e apresentam elevada produção de sementes (Alcântara e Bufarah 2004). Possui variação desde plantas eretas a prostadas, sendo bastante influenciadas pelos locais de ocorrência (Fontinele et al. 2009). São plantas autógamas, com  $2n = 26$  cromossomos e propagação via sementes (Santos et al. 2012).

O valor nutricional da Jureminha (*Desmanthus pernambucanus*) fica entre 24-30% de proteína em matéria seca. Suas características nutritivas permitem sugerir o seu uso no arraçoamento do rebanho durante o período de estiagem, de forma a garantir a manutenção dos animais (Figueiredo et al. 2000). O gênero tem se apresentado como alternativa de alimentação para bovinos, caprinos e ovinos nos períodos secos no semiárido brasileiro (Araújo et al. 2003). A produtividade de matéria seca de plantas deste gênero pode atingir 5,0 t de MS/ha/ano (Clem eCook 2004).

*Desmanthus* pode ser utilizado para formação de banco de proteína (Freitas et al. 2011), mas apresenta grande potencial como alternativa também para pasto, especialmente para as condições edafoclimáticas do semiárido (Diniz Neto 2013). No entanto, ainda há uma carência de estudos sobre o comportamento no sistema produtivo, tais como as formas de manejo e utilização da espécie, para que se possa disponibilizar ao produtor rural (Fontenele 2009). Segundo Queiroz (2012), a presença de plantas de *Desmanthus* spp. pode ser confirmada em 11 municípios do semiárido de Pernambuco: Bom Jardim, Caetés, Floresta, Jataúba, Parnamirim, Petrolina, Santa Cruz, Santa Cruz do Capibaribe, Serra Talhada, Sertânia e Tupanatinga.

## 1.2. Diversidade genética

A divergência genética pode ser quantificada, tanto por marcadores moleculares como por marcadores morfológicos (Andrade Lira 2015). As análises de variabilidade genética podem ser úteis para obter a relação entre os genótipos, caracterizar, predizer cruzamentos e viabilizando a obtenção de genótipos superiores nas gerações segregantes. 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 conservação da diversidade permite ao melhorista a recuperação de genes de germoplasma exótico, para incorporar resistência ou aumentar a base genética dos cultivares dos bancos de germoplasmas (Teodoro 2015).

Portanto, tais informações são cruciais para se iniciar um programa de melhoramento. Assim, primeiro o pesquisador faz uma caracterização mais ampla e, a partir daí, define com maior objetividade os acessos que serão submetidos à etapa de avaliação agrônômica. Etapa esta, em que os acessos são avaliados em experimentos mais elaborados, que permitem a obtenção de informações sobre o desempenho dos genótipos, em relação aos principais caracteres de interesse (Hidalgo 2003; Ondabu et al. 2017).

A distribuição dessa variabilidade entre e dentro das populações é influenciada pelo sistema de cruzamento, fluxo gênico, pela deriva genética (Templeton 2011) ou redução recente do tamanho da população (Chiang et al.



2006). As espécies predominantemente alógamas têm níveis mais altos de variabilidade dentro das populações do que as espécies autógamas (Canovás, et al. 2015).

Tratando-se da estrutura genética de uma população, conhecê-la permite presumir, senão desvendar, quais os fenômenos ecológicos e genéticos atuantes nela (Cruz et al. 2011). Variabilidade genética é a variedade de alelos nos genótipos presente em um grupo sob estudo, seja populações, espécies ou grupo de espécies (Frankham et al. 2008). Essa variabilidade é a matéria-prima sobre a qual a seleção natural atua para permitir a adaptação e evolução dos organismos e sua adequação às mudanças ambientais (Hartl e Clark 2010).

Wright (1951) desenvolveu a estatística  $F$ , que permite entender a distribuição da variabilidade genética entre a variabilidade entre e dentro das populações ( $F_{ST}$ ) (Holsinger e Weir 2009). Apesar da medida  $F_{ST}$  poder variar de zero a um, esses valores são interpretados em quatro faixas. Valor de 0 a 0,05 indica pequena diferenciação genética, 0,05 a 0,15 indica moderada diferenciação genética, 0,15 a 0,25 indica grande diferenciação genética e valor acima de 0,25 indica uma diferenciação genética muito grande (Hartl and Clark 2010).

Como uma das estatísticas de diversidade genética de Nei (1973), o  $G_{ST}$  é equivalente ao  $F_{ST}$  de Wright (1951) quando há apenas dois alelos em um locus. O  $G_{ST}$  é calculado a partir da diversidade genética total nas populações agrupadas  $H_T$  e a diversidade média dentro de cada população ( $H_S$ ), sendo obtida por  $G_{ST} = H_T - H_S / H_T$  (Culley et al. 2002).

Já o índice de Shannon foi inicialmente utilizado em estudos ecológicos para indicar a diversidade de espécies por área. Foi introduzido em 1972 por Lewontin (Lewontin 1972) nos estudos de genética de populações. A utilização desse índice como medida de diversidade populacional é bastante interessante, especialmente quando se trabalha com dados de marcadores dominantes, pois seu uso possibilita contornar o problema da não detecção dos genótipos heterozigotos, já que o índice de Shannon não se baseia na

heterozigosidade da população e, sim na frequência dos amplicons na população (Moura 2003).

### 1.2.1. Avaliação fenotípica

A caracterização morfológica possibilita a descrição da divergência entre os genótipos, bem como definir os genótipos mais promissores e identificar caracteres que ajudem na separação dos mesmos (Martuscello et al. 2015). Portanto, possibilita um melhor manejo dos genótipos e também fornece subsídios para sua conservação e preservação (Souza 2015).

De acordo com o grau de interação com o ambiente, os caracteres descritivos se diferenciam em fixos e variáveis. Os fixos, também denominados qualitativos, dependem de um ou de poucos genes de distribuição discreta, são de fácil identificação e pouco afetados pelo ambiente. As variáveis dependem da ação de muitos ou poucos genes, interagem com o ambiente e manifestam-se, fenotipicamente, com uma distribuição normal, como exemplo a altura de plantas (Silva 2005).

Um dos grandes problemas da utilização dos descritores morfológicos de uma espécie é o grande número de descritores necessários e a grande influência ambiental, principalmente quando se consideram caracteres métricos, na maioria das vezes influenciada por grande número de genes. Para diminuir essa influência do ambiente é importante selecionar caracteres com elevada herdabilidade (Silva et al. 2017). Outro importante indicativo para conseguir sucesso na seleção é obter a relação entre o coeficiente de variação genética e o coeficiente de variação ambiental acima de um. Esses resultados denotam superioridade dos fatores genéticos sobre os ambientais (Marchese et al. 2010).

Os descritores mais utilizados para *Stylosanthes* são: altura da planta, diâmetro do caule, largura do folíolo central, comprimento do folíolo central, número de ramos, massa seca das folhas, massa seca do caule, massa seca de raiz (Karia 2008; Miranda 2013; Oliveira et al. 2016). Já para o gênero *Desmanthus*, altura da planta, diâmetro do caule, número de folíolos por folhas,

e massa seca das folhas (Calado et al. 2016), número de folhas por planta e relação folha/caule, massa seca das folhas e massa seca do caule (Diniz 2016).

### 1.2.2. Caracterização molecular

Marcadores moleculares são características da molécula de DNA, que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente (Ferreira e Grattapaglia 1998). O potencial de uso dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas é bastante amplo, destacando-se a identificação e discriminação de genótipos (Bertan et al. 2009), a quantificação da variabilidade genética, identificação de origem e o monitoramento de cruzamentos (Silva et al. 2014). Os marcadores moleculares também são bastante úteis para realizar seleção precoce, tendo em vista que podem determinar a variabilidade genética em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (Dias et al. 2015).

São vários os avanços da genética molecular em plantas forrageiras. *Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD foram utilizados em *Stylosanthes* para estudar a taxa de cruzamento em *S. capitata* e *S. guianensis* (Chiari et al. 2010), indicando que o primeiro tem um modo misto de reprodução enquanto o segundo é essencialmente autogâmico. Estudos moleculares também demonstraram alta variabilidade dentro do cultivar 'BRS Bela' de *Stylosanthes guianensis* (Matida et al. 2013).

Marcadores baseados em *Simple Sequence Repeat* - SSR foram desenvolvidos visando estudar a diversidade e estruturas populacionais em *Brachiaria* spp. (Ondabu et al. 2017). Os Microssatélites, como também são chamados os SSR, são eficientes para determinar variabilidade genética entre e dentro das populações, mas necessitam de sequências específicas (Santos-Garcia et al 2012).

Já os marcadores *Inter-Simple Sequence Repeat* – ISSR são primers aleatórios. O uso de marcadores ISSR foi eficiente na identificação de variedades de *Urochloa brizantha* de forma precoce, ainda no estágio de plântulas (Braga et al. 2017). Também foram utilizados para estudar a

diversidade genética em *Stylosanthes*. A média de cada iniciador foi de 11,1 e a porcentagem média de fragmentos polimórficos foi de 99,36%. O índice de Shannon (I) foi de 0,355 e a diversidade de Nei (H) foi 0,227 (Yanqiong et al. 2009).

Nagaich (2009) utilizou 5 iniciadores ISSR em 63 acessos provenientes do International Livestock Research Institute (ILRIO) da Etiópia e Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) da Austrália. Nove primers geraram 43 fragmentos, 17 bandas únicas, sendo indicados para separação dos acessos em nível intraespecífico. ISSR são marcadores muito utilizados e se destacam por não requerem informações prévias de sequências de DNA da espécie-alvo, produzem fragmentos com grande reprodutibilidade e requerem pouca infraestrutura em termos de equipamento de laboratório para execução dos experimentos (Dias et al. 2015).

Poucos estudos foram realizados utilizando marcadores moleculares para o gênero *Desmanthus*. No entanto, marcadores de *Amplified Fragment Length Polymorphism* - AFLP foram utilizados em *Desmanthus Illinois*, a diversidade genética de Nei foi de 0,086 (Dehaan et al. 2003). Mais recentemente, Queiroz (2016) também utilizou marcadores AFLP em acessos de *Desmantus* spp. provenientes de Pernambuco e da Austrália, encontrando a maior distância genética de Nei entre os acessos 43F e 100C (0,53) coletados nos municípios de Bom Jardim e Sertânia, respectivamente.

### **1.3. Melhoramento de leguminosas forrageiras no Brasil**

O melhoramento de leguminosas forrageiras nos países tropicais ainda é recente e tem sido intensificado apenas nas últimas décadas (Valle and Jank 2009). Com maior estudos em melhoramento destacam-se *Stylosanthes* spp., leucena (*Leucaena* spp.) e amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) (Herling and Pereira 2016). As metas dos programas de melhoramento têm sido aumentar a produtividade, melhorar a persistência no campo, resistência a doenças e produção de sementes (Vieira et al. 2007).

Os objetivos para *Stylosanthes*, incluem produção de sementes, maior persistência, produção total de matéria seca (Valle et al. 2009; Oliveira 2016) e resistência à antracnose (Falco et al. 2016). No entanto, existe a necessidade de avançar a seleção para cultivares em condições de ambientes específicos, uma vez que as novas tendências de mudança climática e mitigação resultam na seleção de forragens para adaptação a estresses bióticos e abióticos como seca e tolerância ao alumínio (Jank et al. 2011).

A coleta de genótipos de ocorrência natural e a obtenção de linhas puras por meio de sucessivas autofecundações ainda é predominante para *Stylosanthes* (Euclides et al. 2013). Métodos de melhoramento que visem melhor utilizar a variabilidade das espécies têm sido inseridos. A seleção recorrente foi recomendada tanto para *S. guianensis* quanto para *S. capitata* (Resende et al. 2008). Já para o gênero *Desmanthus*, as ações estão limitadas a coleta de ecótipos e avaliados em condições de cultivo sem aplicar métodos de melhoramento (Calado et al. 2016, Fontenele et al. 2009).

No Brasil, os trabalhos de melhoramento com *Stylosanthes* se restringem a Embrapa, especificamente com as espécies *S. capitata* (produção de sementes, produção de matéria seca e resistência à antracnose), *S. guianensis* (produção de sementes e produção de matéria seca) e *S. macrocephala* (tolerantes à antracnose e produção de matéria seca) (Falco et al. 2016, Simeão et al. 2006). Um caso de sucesso é o cultivar de *Stylosanthes* Campo grande. O material comercial foi lançado em 2000, após muitos ciclos de autofecundação de linhagem resistentes a antracnose de *S. capitata*, e *S. macrocephala*. Este cultivar é uma mistura física das duas espécies (Karia 2002).

Expedições de coletas de genótipos de *Stylosanthes* também tem sido organizadas no Nordeste. Oliveira et al. (2015) realizaram algumas expedições de coleta de germoplasma em duas regiões do Semiárido da bahia e constatou uma grande ocorrência de espécies pertencentes ao gênero *Stylosanthes*. Também foram realizadas expedições em Pernambuco. Segundo Galdino (2014), o fator que mais influencia a ocorrência do gênero *Stylosanthes* em Pernambuco o foi o tipo do solo, sendo a maior ocorrência registrada no

Planossolo e Latossolo com aproximadamente 84,3%. Além do tipo de solo características ambientais como temperatura média e precipitação foram determinantes para identificar a ocorrência da planta nos municípios avaliados.

Ao avaliar a variabilidade genética entre os acessos coletados, Santos et al. (2012) encontraram ampla base genética entre os materiais da Bahia indicando a possibilidade de selecionar genitores para serem utilizados em programas de melhoramento genético. Para Oliveira (2016), deve-se destacar as espécies *S. scabra*, *S. humilis*, *S. capitata* e *S. viscosa* para a produção de forragem, sendo observada superioridade de alguns acessos, principalmente os pertencentes à espécie *S. scabra*.

Algumas espécies de *Stylosanthes* possuem elevada taxa de fecundação cruzada, como é o caso de *S. guianensis* e *S. capitata* que apresentam 18% e 12% de fecundação cruzada, respectivamente (Santos-Garcia et al. 2010). Essas espécies que possuem sistema misto de reprodução apresentam vantagem para o melhoramento, pelo fato da ocorrência natural tanto de cruzamentos quanto de autofecundações. Nas espécies alógamas ocorre recombinação natural, porém a depressão endogâmica tende a ser muito elevada. Já nas espécies autógamas, não ocorre depressão em decorrência da endogamia, mas por outro lado, só é possível recombinar através de polinizações artificiais (Maia 2010).

## 1.8. Referências Bibliográficas

Andrade Lira ICS (2015) **Caracterização citogenética e morfoagronômica de acesso de *Stylosanthes* spp. (Fabaceae – Papilionoideae) coletados no nordeste brasileiro**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 60p.

Alcântara PB and Bufarah G (2004) **Plantas forrageiras: gramíneas e leguminosas**. Editora Nobel, São Paulo, p.150.

Almeida JCC, Silva TAA, Nepomuceno DD, Rocha NS, Araújo RP, Pereira TP, Morenz MJF and Abreu JB (2015) Dispersão e persistência de leguminosas forrageiras tropicais após ingestão por bovinos. **Bioscience Journal** 31(3):867-874.

Araújo FS, Pacheco MV, Vieira FA, Ferrari CB, Félix FC and Chagas KPT (2016) ISSR molecular markers for the study of the genetic diversity of *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. **Idesia** 34(3):47-52.

Araújo GGL, Holanda Júnior EV and Oliveira MC (2003) Alternativas atuais e potenciais de alimentação de caprinos e ovinos nos períodos secos no semi-árido brasileiro. In: **Anais-Simpósio Internacional de Caprinos e Ovinos de Corte**, João Pessoa, PB: EMEPA., p. 553-564.

Ashworth AJ, Taylor AM, Reed DL, Allen FL, Keyser PD and Tyler DD (2014) Environmental impact assessment of regional switchgrass feedstock production comparing nitrogen input scenarios and legume-intercropping systems. **Journal of Cleaner Production** 87:227-234.

Benicio CA (2015) **Produção de forragem do capim-buffel consorciado com *Stylosanthes scabra* sob diferentes espaçamentos**. Dissertação de

mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 93p.

Bertan I, Carvalho FIF, Oliveira AC, Benin G, Vieira EA and Valério IP (2009) Morphological, pedigree and molecular distance and their association with hybrid wheat performance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 44:155-163.

Brandão MB and Costa NMS (1979) **O gênero *Stylosanthes* Swartz no Brasil**. Epamig, Minas Gerais, 107p.

Braga I, Yamamoto CJT, Custódio CC and Machado-Neto NB (2017) Differentiation of *Urochloa brizantha* cultivars by intersimple sequence repeat (ISSR) markers in seed samples. **African Journal of Biotechnology**. 16(12):607-614.

Calado TB, Cunha MV, Teixeira VI and Santos MVF (2016) Morphology and productivity of “Jureminha” genotypes (*Desmanthus* spp.) under different cutting intensities. **Revista Caatinga** 29:742-752.

Calles T and Schultze-Kraft R (2016) New species, nomenclatural changes and recent taxonomic studies in the genus *Stylosanthes* (Leguminosae): An update. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales** 4(2):122–128.

Canovas JL, Jimenez JF, Mota JF and Gomez O (2015) Genetic diversity of *Viola cazorlensis* Gand., an endemic species of Mediterranean dolomitic habitats: implications for conservation. **Systematics and Biodiversity** 13(6):571-580.

Casa Grande DR, Sá OAAL and Lara MAS (2013). Perspectivas de utilização de leguminosas. In: Simpósio de pastagens e forragicultura do campo das vertentes. **Anais...** São João Del Rei: UFSJ. p.57-76.



Chiang YC, Hung KH, Schaal BA, Ge XJ, Hsu TW and Chaing TY (2006) Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the *Pinus luchuensis* complex. **Molecular Ecology** 15:765-779.

Chiari L, Resende RMS and Matida ET (2010). Mating system parameters in *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. based on RAPD markers. **African Journal of Biotechnology** 9:5820-5822.

Clem RL, Cook BG (2004). Identification and development of forage species for long- term pasture leys for the southern spear grass region of Queensland. In Whitbread AM and Pengelly BC(Ed.). **Tropical legumes for sustainable farming systems in Southern Africa and Australia**. ACIAR, Canberra, p. 64-79.

Costa NM (2006). **Revisão do Gênero de *Stylosanthes* Sw.** Tese de Doutorado, programa de pós-graduação em Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. Portugal, 2006.

Costa LC, Sartori ALB and Pott A (2008) Estudo taxonômico de *Stylosanthes* em Mato Grosso do Sul. **Rodriguésia** 59:547-572

Culley TM, Wallace LE, Gengler-Nowak KM and Crawford DJ (2002). A comparison of two methods of calculating  $G_{ST}$ , a genetic measure of population differentiation. **American Journal of Botany** 89:460-465.

Cruz CD, Ferreira FM and Pessoni LA (2011). **Biometria aplicada ao estudo da genética da diversidade**. Editora Independente, Viçosa, 620 p.

Dantas AF, Pereira Filho JM, Silva AMA, Santos EM, Sousa BB and César MF (2008). Características da carcaça de ovinos Santa Inês terminados em pastejo e submetidos a diferentes níveis de suplementação. **Ciência e Agrotecnologia** 32:1280-1286.

Dehaan LR, Ehlike NJ, Sheaffer CC, Muehlbauer GJ, Wyse DL (2003). *Desmanthus Illinois* Bundleflower Genetic Diversity Determined by AFLP Analysis. **Crop Science** 43(1):402-408.

Dias FTC, Bertini CHCI, Silva ANOM and Cavalcanti JJV (2015). Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. **Revista Ciência Agronômica**, 46(3):563-572.

Diniz WPS (2016) **Caracterização morfológica e nutricional de acessos de *Desmanthus* spp. submetidos a duas intensidades de corte**. Dissertação de Mestrado, Programa de pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 81p.

Diniz Neto MA, Vasconcelos CM, Cavalcanti E and Silva IF (2013) Disponibilidade de dois solos e diferentes idades de corte no comportamento agrônomo de Jureminha. **Revista Ciência Agronômica** 44:24-33.

Euclides VPB, Valle CB, Macedo MCM, Almeida RG, Montagner DB, Barbosa RA (2013) Brazilian scientific progress in pasture research during the first decade of XXI century. **Revista Brasileira de Zootecnia** 39:151-168.

Falco JS, Fernandes CD, Verzignassi JR, Mallmann G, Queiróz CA, Chagas HA, Batista MV and Quetez FA (2016) Reação de genótipos de *Stylosanthes capitata* à antracnose. **Summa Phytopathologica** 42(2):140-148, 2016.

Fabrice CES, Soares Filho CV, Pinto MF and Perri SHV (2015) Recuperação de pastagens de *Brachiaria decumbens* degradada com introdução de *Stylosanthes* e adubação fosfatada. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 16(4):758-771.

Faleiro FG, Andrade SEM and Reis Junior FB (2011). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Embrapa Cerrados, Brasília, p.730.

Ferreira ME and Grattapaglia D (1998) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética** 3ª ed. EMBRAPA-CENARGEM, Brasília, p. 220.

Figueiredo MV, Guim A, Pimenta Filho EC, Sarmiento JLR, Andrade MVM, Pinto MSC, Lima JA (2000) Avaliação da composição bromatológica e digestibilidade "in vitro" do feno de *Desmanthus virgatus*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., Viçosa, MG, **Anais...** Viçosa, MG: UFV, p.29.

Fontenele ACF, Aragão WA, Rangel JHH and Almeida AS (2009) Leguminosas tropicais: *Desmanthus virgatus* (L.) Wild. Uma forrageira promissora. **Revista brasileira agrociência** 18:121-123.

Frankham R, Ballou JD and Briscoe DA (2008) **Fundamentos de genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 280 p.

Freitas ADS, Silva TO, Menezes RSC, Sampaio EVB, Araújo ER and Fraga VS (2011) Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40(9):1856-1861.

Galdino AG (2014) **Ocorrência e multiplicação de *Stylosanthes* em Pernambuco**. Tese de doutorado, Programa de pós-graduação em zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Gama TC, Volpe E, Lempp B and Galdeia EC (2013) Recuperação de pasto de capim-braquiária com correção e adubação de solo e estabelecimento de leguminosas. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal** 14(4):635-647.

Hartl DL and Clark AG (2010) **Princípios de genética de populações**. Artmed, Porto Alegre, 659 p.

Herling VR and Pereira LET (2016) **Leguminosas forrageiras de clima tropical e temperado**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 98 p.

Hidalgo R (2003). Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. In Franco TLR (Ed.) **Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos**. IPGRI, Cali, p.89.

Holsinger KE and Weir BS (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting  $F_{ST}$ . **Nature Reviews Genetics** 10(9):639-650.

Jank L, Valle CB and Resende RMS (2011). Breeding tropical forages. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 11:27-34.

Lewis GL, Mackinder B and Lock M (2005). **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, London, p.578.

Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology** 6:381-398.

Loiola MIB, Paterno GBC, DINIZ JP, Calado JF and Oliveira ACP (2010) leguminosas e seu potencial de uso em comunidades rurais de São Miguel do Gostoso – RN. **Revista Caatinga** 23(3):59-70.

Lopes J, Evangelista AR and Pinto JC (2011) Doses de fósforo no estabelecimento de capim-xaraés e Estilosantes Mineirão em consórcio. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40(12):2658-2665.

Karia CT (2002) **Caracterização morfológica de acessos do gênero *Stylosanthes* no banco ativo de germoplasma da Embrapa Cerrados - coleção 1994/1995.** Embrapa Cerrados, Planaltina, 24p.

Karia CT (2008) **Caracterização genética e morfoagronômica de germoplasma de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.** Tese de doutorado, Doutorado em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiás. 138p.

Kumar S, Saxena S and Gupta MG (2017) Marker-assisted screening of breeding populations of an apomictic grass *Cenchrus ciliaris* L. segregating for the mode of reproduction. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 17: 10-17.

Marchese A, Maluf WR, Gonçalves Neto AC, Gonçalves RJS and Gomes LAA (2010) Seleção de clones de batata-doce resistentes a *Meloidogyne incognita* raça 1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 45(9): 997-1004.

Maia MCC (2010) Sistema reprodutivo de populações alógamas e autógamas: modelo básico e equilíbrio. **Revista Agroambiente** 4(1):53-54.

Martuscello JA, Braz TGS, Silveira JM, Simeão RM, Ferreira MR, Noronha D and Cunha FV (2015) Diversidade genética em acessos de *Stylosanthes capitata*. **Boletim de Indústria Animal** 72(4):284-289.

Matida ET, Chiari L, Simeão RM, Fernandes CD, Arguelho EG and Both DP (2013) Variabilidade genética de acessos do cultivar 'BRS Bela' de

*Stylosanthes guianensis* usando marcadores moleculares RAPD. **Ciência rural** 43(1):114-119.

Medeiros E and Flores AS (2014) O gênero *Stylosanthes* (Leguminosae) em Roraima. **Rodriguésia** 65:235-244.

Mendes PT, Gonçalves LSA, Amaral Júnior AT, Oliveira EC, Silva VQR and Lopes, AD (2010) Magnitude of the genetic base of commercial popcorn and in recommendation in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 10(4):289-297. ISSN 1984-7033.

Miranda SB (2013) **Divergência morfológicas em *Stylosanthes* spp. Ocorrentes em Pernambuco**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 56p.

Monteiro EMM, Lourenco Junior JB, Santos NFA and Aviz MAB (2009). Valor nutritivo da leguminosa *Pueraria phaseoloides* como alternativa na suplementação alimentar de ruminantes na Amazônia Oriental. **Ciência Rural** 39(2):613-618.

Moura, COM (2005) Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish por isoenzimas e RAPD. Tese de doutorado, Programa de pós-graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal Rural de Lavras, Lavras-MG.

Muir JP, Dubeux Junior, JCB, Santos MVF, Maposse IC, Pitman WD and Butler TJ (2014) Challenges to domesticating native forage legumes. **Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales** 2:94-96.

Nagaich D (2009) Assessment of genetic diversity and identification of informative molecular markers for germplasm characterization in caribbean stylo (*Stylosanthes hamata*). **Journal of plant biochemistry and biotechnology** 18:257-260.

Negreiros JV, Santos AC, Santos PM, Santos TM, Faria AFG (2010) Atributos físicos de solos sob a consorciação gramíneas-leguminosas no norte do estado do Tocantins. **Engenharia na Agricultura** 18(2):140-150.

Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 70: 3321–3323.

Oliveira RS (2015). **Coleta, caracterização e avaliação preliminar de acessos de *Stylosanthes* spp.** Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana 112p.

Oliveira RS, Queiróz MA, Romão RS, Silva, GC and Brasileiro BP (2016). Genetic diversity in accessions of *Stylosanthes* spp. using morphoagronomic descriptors. **Revista Caatinga** 29(1):101-112.

Ondabu N, Maina S, Kimani W, Njarui D, Djikeng A, Ghimire S (2017). Molecular Characterizations of Kenyan Brachiaria Grass Ecotypes with Microsatellite (SSR) Markers. **Agronomy** 7(8):1-13.

Pengelly BC and Liu CJ (2001) Genetic relationships and variation in the tropical mimosoid legume *Desmanthus* assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genetic Resources and Crop Evolution** 48(1)91-99.

Queiroz IV (2012) **Ocorrência e germinação de sementes de *Desmanthus* sp. coletadas no semiárido pernambucano.** Dissertação de mestrado,

Programa de pós-graduação em zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Queiroz IV (2016) **Variabilidade genética e caracterização morfológica, produtiva e qualitativa de acessos de *Desmanthus* spp.** Tese de doutorado, Programa de pós-graduação em zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Queiroz LP (2009) **Leguminosas da caatinga.** Editora da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 467p.

Resende RMS Valle CB and Jank L (2008) **Melhoramento de forrageiras tropicais.** Embrapa, Campo Grande.

Ribeiro OL, Cecato U, Iwamoto BS, Pinheiro A, Jobim CC, Damasceno JC (2011) Desempenho de bovinos em capim-tanzânia adubado com nitrogênio ou consorciado com Estilosantes. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 12(1) 275-285.

Santana Neto JA, Oliveira VS, Valença RL (2015) Leguminosas adaptadas como alternativa alimentar para ovinos no semiárido – revisão. **Revista de Ciências Agroveterinárias** 14(2):191-200.

Santos ECXR, Carvalho R, Almeida EM and Felix LP (2012) Chromosome number variation and evolution in Neotropical Leguminosae from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research** 11(3)2451-2475.

Santos-Garcia MO, Silva GO, Sasaki RP, Ferreira TH, Resende RSM, Chiari L, Karia CT, Carvalho MA, Faleiro FG, Zucchi MI and Souza AP (2012) Using genetic diversity information to establish core collections of *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala*. **Genetics and Molecular Biology** 35:847-861.



Santos LG (2014) **Análise comparativa da pureza das leguminosas forrageiras *Stylosanthes capitata* vog. e *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferr. e Sousa Costa utilizando marcadores moleculares.** Dissertação de mestrado, mestrado em biologia comparada, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 49p.

Silva AR, Silva SA, Almeida VO, Araújo GM and Ledo CAS (2017). Correlations and track analysis for morphoagronomic descriptors in pedigree and parental lines of castor bean. **Ciência Rural** 47(4)1-7.

Silva DS and Medeiros AN (2003) Eficiência do uso dos recursos da Caatinga: produção e conservação. In SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, **Anais...** João Pessoa, p.571-582.

Silva HT (2005) **Descritores mínimos indicados para caracterizar cultivares/variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.).** Embrapa Arroz e Feijão, Goiás. p.32.

Silva JA, Arenhardt E and Gewehr E (2014). Variabilidade genética na busca de eficiência à produção de sementes e biomassa de capim Sudão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola** 18(1):19-24.

Silva SA, Cruz EMO, Reis Ronaldo V, Ferreira CF and Passos AR (2013). Caracterização morfológica e molecular de genótipos de mangaba. **Revista Brasileira de Fruticultura** 35(4):1093-1100.

Simeão RM, Resende MDV, Laura VA, Jank L and Valle CB (2006) Genotypic evaluation of accessions and individual selection in *Stylosanthes* spp. by

simulated BLUP method. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 6: 253-260.

Souza IS (2015) **Caracterização agromorfológica, adaptabilidade e estabilidade de populações e divergência genética entre linhagens de soja**. Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. p. 178.

Stace HM and Edye LA (1984) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Academic Press, Sidney, p.180.

Teodoro PE, RibeiroLP, Correa CCG, Silva FA, Capristo DP, Margues RA, Souza MS and Torres FE (2015) Genetic divergence among maize hybrids in cerrado-pantanal ecotone. **Bioscience Journal** 31:1319-1324.

Templeton AR (2011) **Genética de Populações e Teoria Microevolutiva.**, Sociedade Brasileira de Genética, Riberão Preto-SP, 705 p.

Valle CB and Jank L, Resende RMS (2009) O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres** 56(4):460-472.

Valls JFM (2007) **Caracterização de recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, p.281-305

Vanni RO and Fernandes A (2011). The true identity of *Stylosanthes seabrana* B.L. Maass & L. 't Mannelje (Leguminosae Papilionoideae). **Revista Caryologia** 64(3)247-250.

Vieira EA, Charchar MJA, Silva MS and Anjos JRN (2007) Virulência de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de populações selvagens de *Stylosanthes* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(5):661-667.

Yanqing T, Xinwen H, Jianchun B, Huaxuan H (2009) An analysis by ISSR of genetic diversitie in *Stylosanthes* germoplasms. **Acta prataculturae sinica** 18(1)57-64.

Warwick KFL, Allen PD, Keyser AJ, Ashworth GE, Bates DD, Tyler PL, Lambdin A and HARPER, CA (2016) Biomass and integrated forage/biomass yields of switchgrass as affected by intercropped cool- and warm-season legumes. **Journal of Soil and Water Conservation** 71:21-28.

Wright S (1951). The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, 15(1):323-354.

WUL, F.H.; YU1, X.D.; ZHUANG1, N.S.; LIU, G.D.; LIU1, J.P. Induction and identification of *Stylosanthes guianensis* tetraploids. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.4, p.12692-12698, 2015.

## CAPÍTULO II

---

### **Genetic diversity of *Desmanthus* sp. accessions using ISSR markers and morphological traits**

Artigo aceito para publicação na revista  
Genetics and Molecular Research.  
(Comprovante anexo 5.3)

## **Genetic diversity of *Desmanthus* sp accessions using ISSR markers and morphological traits**

Genetic diversity of *Desmanthus* sp using ISSR markers

**J.C. Costa<sup>1</sup>, G.G.M. Fracetto<sup>2</sup>, F.J.C. Fracetto<sup>2</sup>, M.V.F. Santos<sup>3</sup> and M.A. Lira Júnior<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Corresponding author: M.A. Lira Júnior

E-mail: mariolirajunior@gmail.com

### **ABSTRACT**

*Desmanthus* is a genus of forage legumes with high nutritional value, productive potential, and ability to obtain nitrogen in association with diazotrophic bacteria. The use of accurate techniques for genotype identification and characterization is essential for breeding programs. Morphological markers are widely used to know the genetic diversity and the molecular markers are fundamental in these studies. We investigated the genetic diversity among *Desmanthus* sp genotypes in Pernambuco (Brazilian Northeast State), using morphological traits and ISSR markers. Morphological and molecular characterizations were performed in 18 and 26 accessions, respectively, in plants belonging to the germplasm bank of forage legumes of Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Academic Unit of Serra Talhada, PE, Brazil. Eight ISSR primers were selected, and 95 loci were generated, with polymorphism of 95.79%. The allele number observed was 1.958, where the effective number was 1.359, and the Nei diversity genetic index was 0.226. About the morphological markers, seed number was the variable that most contributed to the genetic divergence. A large amount of genetic diversity was observed among *Desmanthus* species, occurring spontaneously in Pernambuco, Brazil. Thus, the variability found in morphological and ISSR markers is importance for the improvement of

*Desmanthus* spp. Our findings showed that 17L, 27L, 25F, 22F, 19S, 13Au, and 28G accessions could be used in breeding programs to explore the maximum genetic divergence.

**Key words:** Molecular markers; Morphological markers; Breeding programs

## INTRODUCTION

*Desmanthus* is a genus of forage legumes occurring throughout America and has great potential for improved pasture and animal production (Rangel and Gardiner, 2009). These plants are mainly used as fodder because they have high palatability and large seed production (Fontenele et al., 2007, 2009).

In the Brazilian Northeast, *D. pernambucanus* L. Thell predominates (Pengelly and Liu, 2001), which is autogamous ( $2n = 26$  chromosomes), originating in South America, probably in Northeast Brazil (Santos-Garcia et al., 2012). These species are shrub-like, drought resistant, and have a high capacity to obtain nitrogen by association with diazotrophic bacteria, estimating about 30 kg N ha/year coming from biological nitrogen fixation (Freitas et al., 2011).

Although some studies have evaluated the response of *Desmanthus* species to the cut (Trujillo et al., 1996; Gonzalez et al., 2005; Diniz Neto et al., 2013), the cultivation of this plant in Northeast Brazil is non-existent. In the semiarid region of Pernambuco, *Desmanthus* sp occurs in different soil types, as well as different environmental characteristics (Queiroz, 2012). Besides, genotypes collected in this region show desirable morphological and productive characteristics for forage plants (Calado et al., 2016).

To initiate a breeding program, it is essential to know the genetic variability within the population (Melo et al., 2011). The genetic diversity evaluation among germplasm accessions results in information from potential parents to be used in breeding programs, allowing the duplicate identification and the exchange of germplasm among researchers (Martins et al., 2012).

The use of accurate techniques for identifying and characterizing of genotypes is essential for breeding programs and protection of cultivars. Morphological markers are widely used; however, they may present low efficiency in the assessment of available variability (Silva et al., 2013). On the other hand, molecular markers are highly accurate because they detect differences in DNA level and exhibit sufficient polymorphism to discriminate genotypes (Vieira et al., 2015).

ISSR (inter-simple sequence repeat) molecular markers is an excellent tool for the genetic diversity analysis and characterization of accessions and cultivars of several species due to the high degree of polymorphism, reproducibility and low cost (Salazar-Laureles et al., 2015; Brito et al., 2016; Silva et al., 2016).

The ISSR molecular markers use repeated and short sequences of DNA to amplify anonymous loci and do not require prior knowledge of the genome. Because these sequences are dominant loci, it is not possible to distinguish heterozygotes from homozygotes. However, multiple loci can be produced from each PCR (polymerase chain reaction) amplification (Goulão and Oliveira, 2001).

Thus, our study aimed to perform the morphological and molecular characterization of *Desmanthus* sp accessions. Thereby, we investigated the genetic diversity using ISSR markers, unprecedentedly for this genus on literature.

## **MATERIAL AND METHODS**

The morphological characterization was conducted in 16 accessions belonging to the forage legume germplasm bank from the Universidade Federal Rural de Pernambuco - Academic Unit of Serra Talhada, PE (Table 1). The morphological characters related to the plant were: pod number per bunch; leaf number per branch; branch number; plant height (cm); stem diameter (mm); leaflet number per leaf; seed number.

**Table 1.** *Desmanthus* sp accessions and their respective accession numbers, collection city, soil type, latitude, longitude, and altitude, segundo Galdino (2014).

Identification	City	Soil type	Latitude	Longitude	Altitude
58F	Bom Jardim	Entisol	35°31'270"	7°48'187"	163 m
94F*	Bom Jardim	Vertisol	35°41'129"	7°50'151"	335 m
22F*	Bom Jardim	Alfisol	35°32'684"	7°47'466"	297 m
25F*	Bom Jardim	Alfisol	35°32'684"	7°47'466"	297 m
21F*	Bom Jardim	Aridsol	35°32'684"	7°47'466"	297 m
20F*	Bom Jardim	Aridsol	35°33'679"	7°48'632"	300 m
	Santa Cruz do				
28G*	Capibaribe	Entisol	36°14'831"	07°53'504"	509 m
7G	Santa Cruz do	Aridsol	38°44'70"	7°94'58"	448 m
	Capibaribe				
235C*	Sertânia	Ultisol	37°12'159"	8°05'186"	581 m
65F*	Sertânia	Ultisol	35°31'719"	7°46'314"	231 m
100C*	Sertânia	Aridsol	37°18'163"	8°04'039"	559 m
19S*	Serra Talhada	Entisol	38°26'65"	7°95'71"	444 m
17L*	Jataúba	Aridsol	36°26'884"	07°59'198"	517 m
16L*	Jataúba	Aridsol	36°27'227"	07°59'243"	519 m
92L*	Jataúba	Entisol	36°29'058"	08°07'084"	546 m
45L*	Jataúba	Aridisol	36°23'980"	07°58'083"	490 m
15L	Jataúba	Aridsol	36°27'227"	07°59'243"	519 m
27L*	Jataúba	Aridsol	36°26'884"	07°59'198"	517 m
50J	Petrolina	Ultisol	40°19'086"	09°04'875"	373 m
31D	Caetés	Ultisol	38°39'34'	7°99'14"	452 m
13AU*	Austrália				
10AU	Austrália				

All accessions were characterized by ISSR. \*Accessions characterized morphologically and by ISSR.

The data were standardized using the following formula:  $x = (\text{species mean} - \text{general mean}) / \text{standard deviation}$ . Principal component analysis was used to identify the variables that most contributed to the data variation. A cluster analysis was performed to evaluate the similarity degree among the species studied, using Euclidean distance as a unit of measure. These analyses were performed through the Genes program (Cruz, 2013).

For molecular characterization, 22 accessions were used. For DNA extraction, young leaves were collected following the methodology adjusted for this species by Pengelly et al. (2001). The extracted DNA was quantified by



comparison with lambda standards (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) of concentrations known (300, 500, and 100 ng/ $\mu$ L) on 0.8% agarose gel. The purity integrity of the DNA samples was confirmed in a spectrophotometer under UV light (260/280 nm).

For molecular analyses, 8 ISSR primers were used from a set produced by the University of British Columbia, Vancouver, Canada (Table 2). The 25- $\mu$ L reaction mixtures contained 1X PCR buffer (Invitrogen), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8  $\mu$ M primer, 1 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 0.25  $\mu$ M of each dNTP (Invitrogen), 25 ng DNA template, and sterile distilled water to the total volume of 25  $\mu$ L.

**Table 2.** ISSR primers selected for *Desmanthus* sp genotypes, sequence, total amplicons in segregation number per primer, polymorphism percentage (LP), allele numbers ( $N_A$ ), the effective number of alleles ( $N_E$ ), Shannon index (I), and Nei genetic diversity ( $H$ ).

Primer	Sequence	Amplicons	%LP	$N_A$	$N_E$	I	$H$
UBC 1	ACACACACA CACACACT	10	90%	1.888	1.442	0.387	0.254
UBC 2	GAGSGSGA GAGAGAGAT	12	100%	2.00	1.145	0.449	0.289
UBC 808	AGAGAGAGA GAGAGAGC	7	100%	2.00	0.132	0.317	0.192
UBC 810	GAGAGAGA GAGAGAGAT	16	100%	2.00	1.402	0.389	0.248
UBC 812	GAGAGAGA GAGAGAGAA	15	95.5%	1.933	1.523	0.456	0.303
UBC 834	AGAGAGAGA GAGAGAGYT	13	92.3%	1.923	1.304	0.316	0.196
UBC 845	CTCTCTCTC TCTCTCTRG	8	100%	2.00	1.225	0.309	0.179
UBC 888	BDBCACACA CACACACA	14	92.8%	1.928	1.366	0.357	0.255
Total		95	95.8%	1.958	1.359	0.361	0.226

DNA amplifications were performed on thermocycler MJ Reseach, Inc., PTC100 Programmable Thermal Controller (Watertown, USA) under the following conditions: 94°C for 1 min (initial denaturation), followed by 35 cycles

of 94°C for 30 s, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min with a final extension step at 72°C for 5 min (Santos et al., 2012).

The amplification products were separated on a 2% agarose gel stained with Syber Gold (Invitrogen), using the 100-bp marker (Invitrogen) and visualized under ultraviolet light and recorded on the digital photo documentation Vilber Lourmat. The polymorphisms obtained using ISSR were tabulated according to the presence (1) or absence (0) of bands.

Genetic diversity was estimated using the GenAlex 6.5 software (Peakall et al., 2012), with the analysis of the observed number of alleles ( $N_A$ ), an effective number of alleles ( $N_E$ ), Nei genetic diversity ( $H$ ), and Shannon index ( $I$ ). Similarity coefficients were calculated using the Jaccard index (Jaccard, 1908) and the Genes program (Cruz, 2013) was used to construct a dendrogram, using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA).

## RESULTS AND DISCUSSION

About the morphoagronomic markers, the seed number per pod was the variable that most contributed to the genetic divergence, with 60.31%, followed by the branch number with a relative contribution of 30.34% (Table 3). Descriptors with the greatest contribution to divergence are the most important for the breeding program. These descriptors support to select the parents for the creation of segregating populations with a greater probability of success through the combination of these genotypes (Oliveira et al., 2016).

The accession clustering demonstrates three formations of groups considering the mean dissimilarity of 62.5% (Figure 1). The first group was formed for accessions collected in Jataúba, 16L, 92L, 45L, 17L, 25F and 22F, collected in Bom Jardim and Closing the group 100C accession from Sertânia and 27L accession collected in Janaúba.

**Table 3.** Relative importance of eight descriptors for genetic divergence in *Desmanthus* spp.

Characters	S.j	S.j (%)
Pod number per bunch	223.0	0.47
Growth habit	80.0	0.16
Leaf number per branch	175.0	0.36
Branch number	14812.0	30.34
Plant height	121.92	0.25
Stem diameter	1997.08	4.09
Leaflet number per leaf	1815.0	3.72
Seed number per pod	29591.0	60.31

'S.j: contribution of variables to mean Euclidean distance between genotypes i and j'.

The second group was formed by the accessions 21F from Bom Jardim and 19S from Sertânia. The last group was formed by, 20F from Bom Jardim, 13AU, 28G and 235C accessions, from Bom Jardim, Australia, and Santa Cruz do Capibaribe, respectively. The 13AU accession is the result of genotypes collected from Brazil, despite being cultivated in Australia, the 28G from Bom Jardim, Australia, and Santa Cruz do Capibaribe, respectively the last 235C accession from Sertânia.

Plant selection based on morphological characters may be efficient, allowing breeding workers to use genetic variability to aggregate desirable alleles through crosses with superior genotypes (Silva et al., 2014). According to Silva et al. (2013), genetic variability means the possibility to direct the crosses using the most divergent accessions.

In molecular characterization, a total of eight were selected because they exhibited defined amplification patterns. The primers selected to evaluate the 22 accessions amplified 95 DNA fragments in segregation (Table 2). The primer UBC808 resulted in the lowest number of amplified fragments in segregation (7) whereas the primer UBC810 generated the largest number of fragments (16) (Table 2).

The primer UBC1 presented the lowest polymorphism (90%), whereas the primers UBC02, UBC808, UBC810, and UBC834 showed 100% polymorphism (Table 2). The mean of fragments per primer was 11.87 with polymorphism of 95.79%. The data presented here were similar to other studies

found using ISSR markers in other species. Souza Neto et al. (2014) analyzed the genetic diversity of *Anthurium* and obtained 71.43% of polymorphism with the UBC845 primer, 81.82% for UBC808 and 100% with UBC10 (Figure 1). Accessions of the biribazeiro tree when submitted to ISSR markers, presented 81.3% of polymorphism, with a mean of 9 fragments per primer (Lorenzoni et al., 2014).

The  $N_E$  in our study was 1.359 (Table 2), and  $I$  was 0.361. The  $H$  was 0.226, considered moderate to low. The genetic diversity indices varied from 0 to 1 [(0 represents the zero genetic diversity and 1 the maximum genetic diversity (Giustina et al., 2014)]. The primer UBC845 presented values of 0.179 for Nei ( $H$ ) and 0.316 for  $I$ , with the lowest values in comparison to the other primers. The highest values were found when the primer UBC812 was used with values of 0.456 for  $H$  and 0.303 for  $I$ . Our values were similar to the ones reported in the literature for dominant markers (Vieira et al., 2015).

The ISSR markers enabled the differentiation among the *Desmanthus* sp accessions (Figure 2). The lowest genetic distance was observed between 58F and 94F accessions, collected from Bom Jardim and the most divergent accessions were 25F and 19S (Tabela 4).

The formation of six groups was observed, considering the dissimilarity of 82%. The first group had accessions 50J from Petrolina, and 7G from Santa Cruz do Capibaribe. The second group was formed by the 235C and 100C accessions from Sertânia. The third group was formed by 92L, 15L, and 16L accessions, all coming from Jataúba and with altitude above 519 m. Accompanied by two accessions coming from Australia and the 45L accession, also belonging to Jataúba.

The fourth group concentrated the higher accessions number, with eight accessions. The 58F and 94F accessions, both from Bom Jardim, the 28G accession coming from Santa Cruz do Capibaribe, but collected in an Entisol similar to the soil where 58F accession was collected, the 20F, 21F, 22F, 65F, and 17L accessions. Only 17L was not collected in Bom Jardim.



In the fifth group, the 25F accession was isolated. This accession was the only one collected in Bom Jardim and did not group with the other accessions collected in this city. The sixth and last group was represented by 27L and 19S accessions, coming from Jataúba and Serra Talhada, respectively.

All accessions were considered distinct and did not have duplicates. The occurrence of unidentified duplicates in germplasm banks makes it expensive and difficult to maintain the material, generating problems related to the organization and access of users to the genetic resource (Gonçalves et al., 2008).

Achieving dendrograms with similar clusters between morphological and molecular characters has not always been possible. With morphological data of mangaba accession, a dendrogram similar to that produced by the RAPD technique was not obtained (Silva et al., 2013). High correlations are not always obtained due to the interaction between genotype and environment, affecting their expression (Gomes Filho et al., 2010; Samal et al., 2011).

Our selected primers are indicated for future research with genetic diversity and studies of *Desmanthus* sp populations. However, the apparent superiority of the UBC1, UBC2, UBC810, UBC812, and UBC888 primers was observed because they presented a high number of amplified fragments and Nei diversity indexes above the general average of the other primers. The grouping of some accessions was constant in both analyses, although they presented differences between the clusters of the morphological and molecular characterization. Besides, the grouping of most accessions corresponds to the geographic distribution.

Morphological characters and ISSR markers were efficient for the genetic diversity study in *Desmanthus* sp, revealing the diversity among the accessions. Thus, to exploit the maximum genetic divergence, the accessions 17L, 27L, 25F, 22F, 19S and 28G can be used in future breeding programs, because they differ from other accessions by both morphological and molecular markers.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brazil) for the “Prodoutoral/CAPES” fellowship for J.C. Costa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brazil), and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE, Pernambuco, Brazil) for research funding.

## REFERENCES

Brito FA, Nizio DAC, Silva AVC, Diniz LEC, et al. (2016). Genetic diversity analysis of *Varronia curassavica* Jacq. accessions using ISSR markers. *Genet. Mol. Res.* 15 (3). <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038681>

Calado TB, Cunha MV, Teixeira VI, Santos MVF, et al. (2016). Morphology and productivity of “Jureminha” genotypes (*Desmanthus* spp.) under different cutting intensities. *Rev. Caatinga* 29: 742-752. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n326rc>

Cruz CD (2013). GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Sci.-Agron.* 35: 271-276. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>

Diniz Neto MA, Vasconcelos RCM, Cavalcante LF, Pimenta Filho EC, et al. (2013). Disponibilidade de dois solos e diferentes idades de corte no comportamento agrônomo de Jureminha. *Rev. Ciênc. Agron.* 44: 24-33. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902013000100004>

Fontenele ACF, Aragão WM and Rangel JHA (2007). Biometria de frutos e sementes de *Desmanthus virgatus* (L) Willd nativas de Sergipe. *Rev. Bras. Biociênc.* 5: 252-254.

Fontenele ACF, Aragão WM, Rangel JHA and Almeida AS (2009). Leguminosas tropicais: *Desmanthus virgatus* (L.) Wild. Uma forrageira promissora. *Rev. Bras. Agrobiol.* 15: 121-123.  
<http://dx.doi.org/10.18539/cast.v15i1-4.1998>

Freitas ADS, Silva TO, Menezes RSC, Sampaio EVSB, et al. (2011). Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. *Rev. Bras. Zootecn.* 40: 1856-1861.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982011000900003>

Galdino AC (2014) Ocorrência e multiplicação de *Stylosanthes* em Pernambuco. (Tese doutorado) Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 94p.

Giustina LD, Luz LN, Vieira FS, Rossi FS, et al. (2014). Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). *Genet. Mol. Res.* 13: 47-53.  
<http://dx.doi.org/10.4238/2014.February.14.5>

Gomes Filho A, Oliveira JG, Viana AP, Siqueira APO, et al. (2010). Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). *Acta Sci.-Agron.* 32: 627-633.  
<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v32i4.4720>

Gonçalves LSA, Rodrigues R, Sudré CP, Bento CS, et al. (2008). Divergência genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparação com



descritores multicategóricos. *Hortic. Bras.* 26: 364-370.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362008000300014>

Gonzalez-V EA, Hussey MA and Ortega-S JA (2005). Nutritive value of *Desmanthus* associated with kleingrass during the establishment year. *Rangeland Ecol. Manag.* 58: 308-314. [http://dx.doi.org/10.2111/1551-5028\(2005\)58\[308:NVODAW\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2111/1551-5028(2005)58[308:NVODAW]2.0.CO;2)

Goulão L and Oliveira CM (2001). Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122: 81-89. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1012691814643>

Lorenzoni RM, Soares TCB, Santiago VF, Silva JA, et al. (2014). Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. *Rev. Bras. Frutic.* 36: 251-257. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500029>

Martins GV, Martins LSS, Veasey EA, Lederman IE, et al. (2012). Diversity and genetic structure in natural populations of *Hancornia speciosa* var. *speciosa* Gomes in northeastern Brazil. *Rev. Bras. Frutic.* 34: 1143-1153. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000400023>

Melo RA, Resende LV, Menezes D, Beck APA, et al. (2011). Genetic similarity between coriander genotypes using ISSR markers. *Hortic. Bras.* 29: 526-530. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362011000400014>

Oliveira RS, Queiróz MA, Romão RS, Silva, GC, et al. (2016). Genetic diversity in accessions of *Stylosanthes* spp. using morphoagronomic descriptors. *Rev. Caatinga* 29: 101-112. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n112rc>

Pengelly BC and Liu CJ (2001). Genetic relationships and variation in the tropical mimosoid legume *Desmanthus* assessed by random amplified

polymorphic DNA. *Genet. Resour. Crop Ev.* 48: 91-99.  
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1011234913710>

Peakall R and Smouse PE (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>

Queiroz IV (2012). Ocorrência e germinação de sementes de *Desmanthus* sp. coletadas no semiárido pernambucano. Master's thesis. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. Available at [[http://www.pgz.ufrpe.br/sites/ww2.prppg.ufrpe.br/files/ildja\\_viviane\\_de\\_queiroz.pdf](http://www.pgz.ufrpe.br/sites/ww2.prppg.ufrpe.br/files/ildja_viviane_de_queiroz.pdf)]

Rangel JHA and Gardiner CP (2009). Stimulation of wool growth by *Desmanthus* spp. as a supplement to a diet of Mitchell grass hay. *Trop. Grasslands* 43: 106-111.

Salazar-Laureles ME, Pérez-López DJ, González-Huerta A, Vázquez-García LM, et al. (2015). Genetic variability analysis of faba bean accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Chil. J. Agr. Res.* 75: 122-130. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392015000100017>

Samal KC, Jena RC, Swain SS, Das BK, et al. (2011). Evaluation of genetic diversity among commercial cultivars, hybrids and local mango (*Mangifera indica* L.) genotypes of India using cumulative RAPD and ISSR markers. *Euphytica* 76: 1-19. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-011-0522-y>

Santos-Garcia MO, Toletto-Silva G, Sasaki RP, Ferreira TH, et al. (2012). Using genetic diversity information to establish core collections of *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala*. *Genet. Mol. Biol.* 35: 847-861. DOI: 10.1590/S1415-47572012005000076

Silva AS, Cruz EMO, Reis RV, Ferreira CF, et al. (2013). Caracterização morfológica e molecular de genótipos de mangaba. *Rev. Bras. Frutic.* 35: 1093-1100. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000400021>

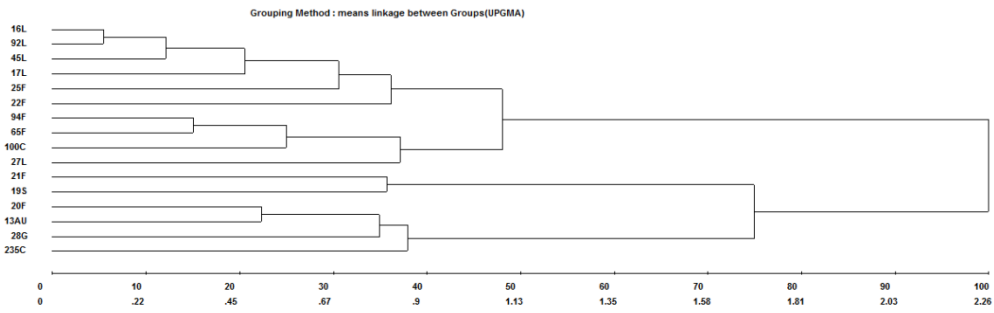
Silva BM, Rossi AAB, Dardengo JFE, Araújo VAAC, et al. (2016). Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. *Cienc. Rural* 46: 108-113. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141634>

Silva JAG, Arenhardt EG and Gewehr E (2014). Variabilidade genética na busca de eficiência à produção de sementes e biomassa de capim Sudão. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 18: 19-24. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662014000100003>

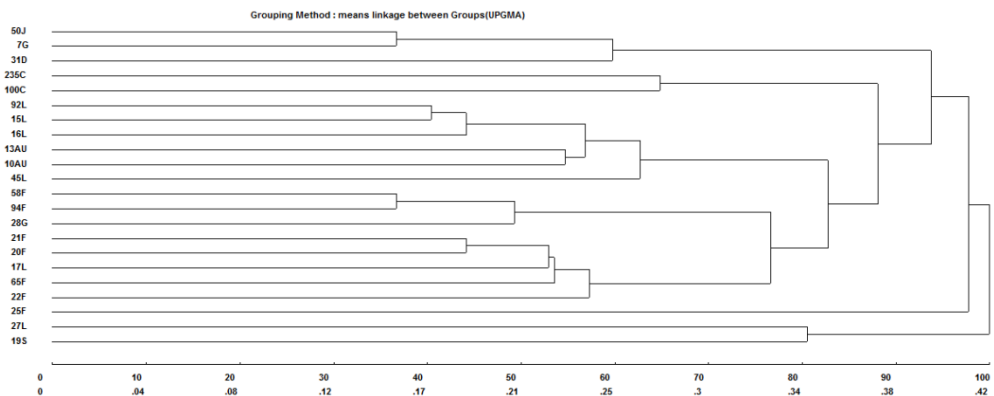
Souza Neto JD, Soares TCB, Motta LB, Cabral PDS, et al. (2014). Molecular characterization of *Anthurium* genotypes by using DNA fingerprinting and SPAR marker. *Genet. Mol. Res.* 13: 4766-4775. <http://dx.doi.org/10.4238/2014.July.2.6>

Trujillo W, Pitman WD, Chambliss CG and Williams K (1996). Effects of height and frequency of cutting on yield, quality and persistence of *Desmanthus virgatus*. *Trop. Grasslands* 30: 367-373.

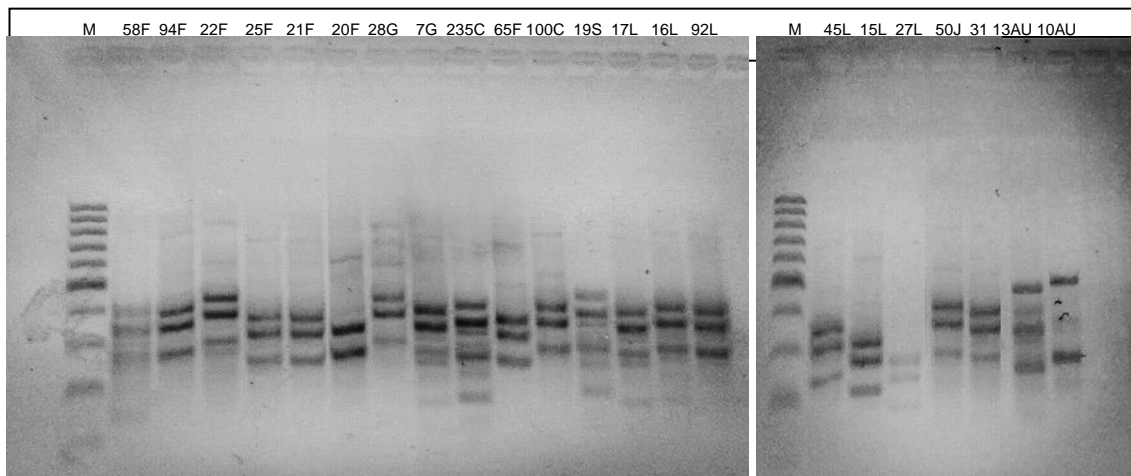
Vieira FA, Sousa RF, Silva RAR, Fajardo CG, et al. (2015). Diversidade genética de *Copernicia prunifera* com o uso de marcadores moleculares ISSR. *Rev. 12Bras. Ciênc. Agrar.* <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v10i4a5040>



**Figure 1.** Morphological dissimilarity dendrogram using the UPGMA method in 16 *Desmanthus* sp accessions belonging to the germplasm bank from Universidade Federal Rural de Pernambuco, Academic Unit of Serra Talhada, PE.



**Figure 2.** ISSR dissimilarity dendrogram using the UPGMA method in 22 *Desmanthus* sp accessions belonging to the germplasm bank of Universidade Federal Rural de Pernambuco, Academic Unit of Serra Talhada, PE.



**Figure 3.** Agarose gels showing the electrophoretic profiles of the inter-simple sequence repeat markers amplified using the primer UBC 810 in 22 *Desmanthus* sp. plants. M: 100-pb molecular weight marker.

### CAPÍTULO III

---

**Características morfológicas, parâmetros genéticos e informações climáticas para *Stylosanthes* spp. coletados em Pernambuco, Brasil**

Artigo a ser enviado para publicação na revista Crop Breeding and Applied Biotechnology.

## **Características morfológicas, parâmetros genéticos e informações climáticas para *Stylosanthes* spp. coletados em Pernambuco, Brasil**

### **Resumo**

Plantas do gênero *Stylosanthes* ocorrem naturalmente em áreas de pastagens nativas no semiárido pernambucano e são altamente selecionadas pelos animais. O Nordeste brasileiro destaca-se como importante centro de origem deste gênero. Objetivou-se avaliar as características morfológicas em genótipos de *Stylosanthes* spp. coletados no semiárido de Pernambuco e suas correlações com o ambiente de ocorrência. Coletou-se plantas do gênero em oito *sites* no semiárido pernambucano em Setembro de 2015. Os acessos foram cultivados entre os meses de Novembro de 2015 a Abril de 2016 em telado do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com oito genótipos e quatro repetições com quatro plantas por parcela. Constatou-se a existência de variabilidade entre as espécies de *Stylosanthes* que ocorrem de forma espontânea em Pernambuco. As estimativas de herdabilidade variaram entre 61,16 e 99,67% para massa de nódulos e comprimento do apêndice da semente, respectivamente. O maior valor da relação  $CV_g/ CV_e$  para os caracteres morfológicos foi de 8,73 para comprimento do apêndice da semente. As espécies *S. scabra* e *S. seabrana* se destacaram por maior produção de massa seca de folhas. Foi possível encontrar espécies com grande dissimilaridade mesmo em áreas com características ambientais semelhantes. As informações dos locais de coleta poderão ser importantes no futuro para agregar informações aos genótipos e facilitar tomadas de decisões em futuros programas de melhoramento genético. A alta variabilidade morfológica dos acessos evidencia a importância desse material para futuros trabalhos de melhoramento genético.

**Palavras chave:** Diversidade genética, leguminosa forrageira, melhoramento genético, variabilidade

## ABSTRACT

Plants of the genus *Stylosanthes* occur naturally in areas of native pasture in the Pernambuco's semi-arid and are highly selected by the animals. The Brazilian Northeast stands out as an important center of origin of this genus. The objective of this study was to evaluate the morphological characteristics of *Stylosanthes* spp. genotypes. Collected in the semi-arid region of Pernambuco and their correlations with the occurrence environment. Genotypes collected in the semi-arid region of Pernambuco and its correlations with the occurrence environment. Plants of the genus were collected in eight sites in the month of September of 2015. The work was carried out Between the months of November 2015 to April 2016 at the greenhouse of the Department of zootecnia of the Federal Rural University of Pernambuco in the Campus of Two Brothers, in Recife, Pernambuco. The experimental design was randomized blocks with four replications with four plants per plot. A large amount of genetic diversity was observed between species *Stylosanthes* that occur spontaneously in Pernambuco, Brazil. Heritability estimates range between 61.16 and 99.67% for the mass nodes and, respectively. The highest ratio  $CV_g / CV_e$  was 8.73 for Seed Appendix length. It was possible to determine various characteristics with high canonical correlations. The species *S. scabra* and *S. seabrana* stood out for higher dry matter yield of leaves. It was possible to find species with great dissimilarity even in areas with similar environmental characteristics. Information from collection environments may be important in the future by aggregating information to genotypes and facilitating the decision-making in future breeding programs. The high variability of access demonstrates the importance of this material for future work on breeding.

**Key words:** Genetic diversity, Forage legume, Genetic breeding, Variability.



## Introdução

A região semiárida do Nordeste passa por grandes períodos de estiagem, considerando que a pecuária tem importante papel nessas áreas, é necessário a busca por arranjos produtivos locais que incluam espécies forrageiras adaptadas a região e que forneçam alimentos para os animais mesmo no período seco (Benicio et al. 2015). Nesse contexto, algumas leguminosas nativas são como uma importante alternativa, sendo alvo de estudos para uso nas regiões de clima semiárido (Santana Neto et al. 2015).

Dentre os gêneros de leguminosas forrageiras destaca-se o *Stylosanthes*. Essas leguminosas se destacam pela fixação de Nitrogênio e por possuírem altos níveis de proteínas. Assim, atuam na melhoria da fertilidade dos solos e na qualidade da forragem produzida (Freitas et al. 2011). De acordo com Mendonça et al. (2017), *S. capitata* e *S. macrocephala* podem fixar 150 kg.ha<sup>-1</sup> de Nitrogênio ao ano.

O gênero *Stylosanthes* é originário da América do Sul (Stace and Edye.,1984). Apesar de ter-se em torno de 50 espécies de *Stylosanthes* descritas no mundo (Costa 2008), poucos são os cultivares disponíveis nos mercados nacional e internacional (Calles 2016). As espécies desse gênero ainda têm muito a crescer como cultura agrícola no Brasil (Gama et al. 2013). Programas de melhoramento ainda precisam ser implementados visando explorar toda a variabilidade do gênero.

Ao planejar iniciar um programa de melhoramento, é necessário quantificar a variabilidade genética existente na população a ser trabalhada. A diversidade genética pode ser estudada por meio de caracteres agronômicos, morfológicos e moleculares (Oliveira et al. 2016, Santos-Garcia et al. 2012). A utilização de caracteres morfológicos é importante, por ser útil no manejo dos recursos genéticos, auxiliando na caracterização de plantas no banco de germoplasma, e permitindo identificar materiais promissores (Martuscello et al. 2015). As informações das condições ambientais dos locais de coleta também são dados importantes, considerando que tais condições ambientais estão associadas a diferentes padrões de variabilidade genética (Barros et al. 2005).

Os objetivos do melhoramento de plantas forrageiras dependem da finalidade de uso da planta, seja ela para pastejo ou corte. Assim, diferentes ideótipos são necessários para atender as diversificadas demandas (Monteiro et al. 2016). O principal método de melhoramento genético de espécies forrageiras tropicais no Brasil ainda é a seleção a partir da variabilidade natural das coleções de plantas, visando propósitos específicos e adaptação as regiões (Valle et al. 2009). O melhoramento de *Stylosanthes* tem focado a produção de sementes, melhorar a persistência no campo, resistência à antracnose e seleção de genótipos para utilização em consórcio (Oliveira et al. 2015, Falco et al. 2016).

Diante desses pressupostos, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização morfológica de algumas espécies de *Stylosanthes* coletadas no semiárido de Pernambuco, bem como registrar as condições climáticas dos locais de coleta.

### **Material e métodos**

No mês de setembro de 2016, foram realizadas coletas em oito *sites* do semiárido de Pernambuco, sendo coletadas as sementes para posterior propagação. Em cada local de coleta foram realizadas observações a respeito das características geográficas (altitude, latitude e longitude, através de GPS com altímetro). Já as características climáticas foram obtidas através de informações do sistema de monitoramento agrometeorológico do Instituto Nacional de Meteorologia-INMET. Foi considerado, Precipitação anual (mm/ano), Temperatura máxima (°C), Temperatura mínima (°C) e Evapotranspiração potencial (mm/ano), resultantes da média dos últimos dezesseis anos.

Dos acessos coletados e cultivados, a caracterização fenotípica foi realizada com 8 acessos de diferentes espécies, propagados por sementes, coletadas em diferentes locais em Pernambuco no mês de setembro de 2015 (Tabela 1). Os acessos foram selecionados por apresentarem fenótipos diferenciados em condições de campo nos locais de coleta. Para identificação das espécies, as plantas foram coletadas e enviadas ao Departamento de

botânica do Instituto Agronômico de Pernambuco- IPA para identificação das espécies. As sementes de cada planta foram utilizadas com material de propagação para condução do experimento.

**Tabela 1.** Lista de espécies de *Stylosanthes* coletados no estado de Pernambuco e dados ambientais.

Número	1	2	3	4	5	6	7	8
Nome da espécie	<i>S. scabra</i>	<i>S. seabrana</i>	<i>S. angustifolia</i>	<i>S. humilis</i>	<i>S. hamata</i>	<i>S. scabra</i>	<i>S. Macrocephala</i>	<i>S. mucronata</i>
Origem	Sertânia	Floresta	Petrolina	Santa Cruz do Capibaribe	Petrolina	Sertania	Tupanatinga	Caetés
Coordenadas Longitude	36°27'	38°16'	42°29'	37°27'	40°29'	37°27'	36°45''	36°33'
Coordenadas Latitude	08°20'	08°34'	09°21''	08°32'	09°20'	08°32'	08°08'	08°49'
Altitude	670m	528m	398m	517m	421m	560m	461m	858m
Precipitação	348mm	330mm	324mm	466mm	324mm	348mm	641mm	620mm

As sementes foram submetidas à imersão em água por 24 horas para quebrar a dormência. Posteriormente, as sementes foram colocadas para germinar em bandejas de isopor de 128 células em substrato de casca de pinus. Quando as plantas apresentaram 7 folhas definitivas, as mudas foram transferidas para vasos contendo 4 quilos de solo. Foram utilizadas amostras de solo coletadas da camada superficial de um Latossolo vermelho eutrófico, coletado no campus Recife da UFRPE. O solo coletado e peneirado em malha de 6,0 mm antes da transferência para os vasos.

As plantas foram conduzidas em telado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, no período de 15 de novembro de 2015 a 15 de abril de 2016. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com oito genótipos e quatro repetições, com quatro plantas por parcelas.

As plantas foram irrigadas diariamente. Durante a condução do experimento não correu adubação. O controle de pragas foi realizado com uma aplicação de calda a base de Neem com concentração de 10% visando prevenir o ataque de pulgões aos 45 dias após o plantio. As plantas foram conduzidas sem podas. O florescimento das plantas foi monitorado

diariamente, sendo computados o número de dias para iniciar o florescimento e o número de dias para o pleno florescimento. O corte das plantas foi definido quando a primeira espécie entrou no estágio de senescência. Fato que ocorreu aos 232 dias para a espécie de *S. hamata*.

Aos 232 dias avaliou-se: altura da planta (cm) - AP, diâmetro do caule (mm) - DC, largura do folíolo central (mm) - LF, comprimento do folíolo central (mm) - CF. Ao apresentarem 234 dias, as plantas foram cortadas acima da superfície do solo e conduzidas ao laboratório e avaliou-se: Largura da inflorescência (mm) - LI, comprimento da inflorescência (mm) - CI, Largura da estípula (mm) - Lest, comprimento Largura da estípula (mm) - Cest comprimento do apêndice da semente (mm) - Capen, Largura da semente (mm) - Lsem, comprimento da semente (mm) - Csem e massa fresca de nódulos (mg) - MN.

As plantas foram separadas em folha, hastes e raízes e colocadas para secar a 65 °C em estufa até atingirem peso constante obtendo-se, a massa seca de cada parte em gramas, utilizando-se balança de precisão de 0,01 g. A partir disso, foi obtido massa seca das folhas (g) - MSF, massa seca das hastes (g) - MSH, massa seca de raiz (g) - MSR (Albuquerque et al. 2013). A relação folha/hastes -RelF/Hfoi obtida pela relação entre a massa seca da folhas pela massa seca das hastes.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), posteriormente, foram estimados os seguintes parâmetros genéticos: herdabilidade ( $h^2$ ), coeficiente de variação genético ( $CV_g$ ) e a relação entre coeficiente de variação genético e coeficiente de variação ambiental ( $CV_g/CV_e$ ). A distância generalizada Mahalanobis ( $D^2$ ) foi utilizada para se estabelecer a matriz de dissimilaridade genética entre os acessos com base nas características avaliadas. Os acessos foram então agrupados por meio do método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). A comparação entre médias foram avaliadas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade. Também foram analisadas as correlações de Pearson entre as características morfológicas e os dados ambientais ao nível de e 1% e

5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando módulos no software Genes (Cruz 2013).

## Resultados e Discussão

Foi possível coletar sete diferentes espécies de *Stylosanthes* em Pernambuco, *S. angustifolia*, *S. scabra*, *S. seabrana*, *S. humilis*, *S. hamata* e *S. macrocephala* e *S. mucronata*. Para Calles and Schultze-Kraft (2016), existem 9 espécies de *Stylosanthes* com importância econômica no mundo, esse estudo comprova a ocorrência de seis dessas espécies em Pernambuco. *S. swabrana* é considerada a mais recente espécie descrita do gênero, anteriormente com ocorrência registrada apenas no estado da Bahia (Maass and Mannelje 2002).

As espécies foram encontradas em condições diferentes. *S. macrocephala*, *S. scabra* e *Stylosantes mucronata* foram encontrados nas margens de rodovias. *S. scabra* foi coletada em duas condições, ambas no município de Sertânia. O acesso 1 foi coletado na margem da rodovia, enquanto o segundo acesso foi encontrado em uma área de caatinga com sinais de pastejo e presença de caprinos.

*S. humilis* foi encontrada em uma área de pasto para bovinos com presença de gramíneas. A precipitação média anual do município da coleta foi de 466 mm, comprovando que o gênero apresenta espécies tolerantes a locais com precipitação mais robustas. Essa espécie é mais frequentemente registrada em locais de menor precipitação na Caatinga e no Cerrado (Costa 2006, Fortuna-Peres et al, 2011).

Já *S. angustifolia* foi encontrado com poucas folhas em uma área limpa sem vegetação com poucos indícios de disponibilidade de água. Em um ponto bem próximo foi encontrada *S. hamata* em meio a muitas pedras e fezes de caprinos. As sementes dessas espécies podem ter sido transportadas por animais até a referida área, uma vez que as duas sementes possuem artículos bem desenvolvidos. Segundo Guimarães (1991), as sementes do artículo apical de *S. angustifolia*, além de apresentar estrutura adaptada à dispersão à longa distância, quando não escarificadas, apresentam maior dormência do

que as sementes do artículo basal, o que provavelmente está relacionado à estratégia de colonização de novas áreas.

Apenas três dos oito locais de coletas apresentaram altitude abaixo de 500 m. Barros et al. (2005) relataram a presença de plantas de *S. macrocephala* em locais com altitudes na faixa de 664 a 825 m nos Estados da Bahia e Minas Gerais. No entanto, algumas espécies ocorrem com mais abundância em menores altitudes. Queiroz et al. (2001) relataram ocorrência de plantas de *Stylosanthes* spp. em locais com altitudes que variam do nível do mar a 889 m de altitude.

Seis dos oito acessos analisados foram coletados em regiões com precipitação menor que 500mm. A maior ocorrência de plantas de *Stylosanthes* é registrada em áreas com precipitações médias anuais entre 550-700 mm (Barros et al. 2005). Entretanto, devido ao grande número de espécies, o gênero *Stylosanthes* pode ser encontrado em regiões com diferentes índices de precipitação pluviométrica. *S.scabra*, por exemplo, tolera faixas que variam entre 280 - 1247 mm/ ano (Oliveira et al. 2016).

As variáveis analisadas apresentaram valores de herdabilidade acima de 90% (Tabela 2). A existência de variabilidade genética, e alta herdabilidade indicam possibilidade de alto poder seletivo e com alta expectativa de ganho genético (Figueiredo et al. 2012). Apenas MN apresentou herdabilidade mais baixa (61,2%). A maior influência ambiental nessa característica pode ser resultado da dificuldade na separação entre nódulos e raízes. Deve-se levar em consideração também que a água utilizada na irrigação também pode trazer diferentes bactérias que interagem com as espécies de *Stylosanthes*.

As relações  $CV_g/ CV_e$  das variáveis também foram elevadas com exceção da variável MN, as demais variáveis apresentaram valores superiores a 1,4. Oliveira et al. (2015), determinando os parâmetros genéticos em *Stylosanthes capitata*, *S. viscosa*, *S. scabra* e *S. humilis*, observaram razões  $CV_g/CV_e$  maiores que 1 para os caracteres AP, DC, Cest, Lest, CF e LF. No mesmo estudo as variáveis MSF e MSH apresentaram  $CV_g/CV_e$  menor que 1.

**Tabela 2.** Características dos ambientes de coleta, parâmetros genéticos associados às características morfológicas de *Stylosanthes* spp. coletadas no estado de Pernambuco.

	<i>S.sca bra</i>	<i>S.sea Brana</i>	<i>S.angusti folia</i>	<i>S.humilis</i>	<i>S.hamata</i>	<i>S. scabra</i>	<i>S.macro cephala</i>	$\delta$	CV (%)	CVg/ CVe	$h^2$ (%)
AP	65.7bc	67.5bc	75.2b	62.0c	30.5d	61c	64.5bc	92.0a	8.1	3.2	97.7
DC	7.0a	7.0a	4.5c	5.5ab	5.0ab	6.7b	5.7b	5.0b	11.5	1.4	88.6
LF	9.0a	7.7 <sup>a</sup>	4.0b	5.5b	4.5b	8.5a	9.2a	4.5b	13.7	2.4	95.8
CF	23.3bc	19.0c	38.8 <sup>a</sup>	19.5c	8.8d	23.3bc	24.8b	20.0bc	9.3	3.9	98.4
MSF	5.7a	3.7b	3.1bc	1.6cd	0.1d	6.1a	4.3ab	1.7cd	24.1	2.6	96.4
MSH	10.8a	11.4 <sup>a</sup>	7.6bc	6.1c	1.2d	10.5a	10.5a	9.8ab	13.4	2.1	94.7
RelF/H	0.5ab	0.3bcd	0.4abc	0.2cd	0.1e	0.6a	0.4abc	0.2de	28.7	1.7	92.4
MSR	2.9a	2.8 <sup>a</sup>	1.0bc	0.4c	0.5bc	2.5a	1.1bc	1.3b	23.5	2.7	96.8
MN	120.0a	70.0ab	70.0ab	50.0ab	50.0b	100.0a	70.0ab	80.0ab	40.6	0.6	61.2
LI	6.3b	5.7bc	2.1e	5.5bcd	4.5d	6.2b	10.4a	5.1cd	7.6	5.2	98.1
CI	12.7b	12.0bc	30.2 <sup>a</sup>	11.3bc	12.2bc	12.1bc	12.2bc	10.5c	5.7	8.0	99.6
Lest.	6.2bc	5.0d	5.1cd	5.5cd	3.7e	6.1bcd	10.5a	6.9b	8.4	3.9	98.3
Cest	6.7b	6.9b	6.1b	4.7c	3.5c	6.7b	11.0a	4.7c	16.4	2.1	94.7
Capend	2.0C	2.0C	5.2b	6.8a	5.4b	2.0c	1.4d	2.0c	7.2	8.7	99.7
Lsem	1.7b	2.0a	1.0c	1.7b	1.6b	1.6b	2.0a	1.8b	6.9	2.6	96.5
Csem	2.0d	2.6bc	3.1a	3.1a	3.0ab	2.2cd	2.5c	2.5c	6.9	2.2	95.0
lfl	15.0c	145.0d	166.0b	155.0c	72.0f	155.0c	200.0a	122.0e	1.1	22.4	99.9
Pflo	166.0c	160.0d	190.0b	166.0c	115.0f	166.0c	220.0a	155.0e	0.9	20.8	99.9
Alt	670.0b	528.0d	398.0h	517.0e	421.0g	460.0c	461.0f	858.0a	-----	-----	-----
Prec	348.6d	330.6e	324.8f	466.07c	324.8f	348.6d	641.0a	620.0b	-----	-----	-----
Tmax	32.9c	34.3 <sup>a</sup>	33.3b	31.0f	33.0b	32.9c	32.0e	32.5f	-----	-----	-----
Tmin	21.0a	22.4 <sup>a</sup>	22.4 <sup>a</sup>	20.0d	22.4a	21.0b	20.0d	20.1c	-----	-----	-----
Ev	316.4d	280.7e	274.7e	350.0c	274.7e	323.9c	408.5b	551.2a	-----	-----	-----

AP - Altura da planta (cm), DC - Diâmetro do caule (mm), LF - Largura do folíolo central (mm), CF - Comprimento do folíolo central (mm), MSF - Massa seca das folhas(g), MSC - Massa seca das hastes (g), RelF/H- Rlação folha hastes, MSR - massa seca de raiz (g), MN - Massa de nódulos (mg), LI - Diâmetro da inflorescência (mm), CI-Comprimento da fol da inflorescência (mm), Lest.- Largura da estípula (mm), Cest - Comprimento da estípula (mm), Capend - Comprimento do apêndice da semente (mm), Lsem - Largura da semente (mm), Csem - Comprimento da semente (mm), lfl – Início do florescimento (dias), Pflo – Pleno florescimento (dias), Alt - Altitude (m), Prec – Precipitação anual (mm/ano), Tmax – Temperatura máxima (°C), Tmin - Temperatura mínima (°C), Ev – Evapotranspiração real (mm/ano). Médias seguidas de letras diferentes entre os genótipos, diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0.05).

Letras diferentes na horizontal mostram diferenças significativas entre as espécies.

Em nossos estudos todos esses caracteres apresentaram a relação maior que 1. Os elevados valores deve-se as plantas terem sido conduzidas em casa de vegetação, o que permite maior controle das condições ambientais.

Para MSF e MSH, em nossos estudos essas características apresentaram 2,58 e 2,13, Oliveira et al. (2015) obtiveram 0,75 e 0,69. Segundo Marchese et al. (2010), existe uma situação muito favorável para a obtenção de ganhos na seleção quando a razão CVg/CVe tende a 1,0 ou maior que 1,0, nesses casos, a variação genética supera a variação ambiental.

O acesso 8 apresentou a maior altura entre as plantas com média de 92 cm, enquanto *S.hamata* apresentou a menor altura com 30,5 cm (Tabela 2). No entanto, o gênero *Stylosanthes* pode alcançar até 1,8 m (Fortuna-Peres et al. 2011). Já *S. scabra* destacou-se em uma característica importante para espécie forrageira, produção de massa seca. Segundo Resende et al. (2006), o descritor MSF está entre as características de maior interesse para os produtores e em programas de melhoramento os acessos selecionados para produção de sementes e tolerância a doenças como antracnose, também devem ser avaliados para produção de massa.

Para relação folha/haste, os acessos de *S. scabra* variaram de 0,54 a 0,56, seguidos de *S. angustifolia* com 0,41 e *S. seabrana* com 0,33. Deve-se resaltar que esses resultados foram obtidos com as plantas após a produção de sementes. O que justifica valores menores que os encontrados por Teixeira et al. (2010) que obtiveram RelF/H de 0,8 e 0,9 para *S. guianensis* cv. Mineirão e *S. macrocephala* cv. Pioneiro, respectivamente, aos 102 dias após o transplântio, com corte realizado rente ao solo.

*S. hamata* foi a espécie mais precoce, florescendo aos 75 dias. *S.seabrana* floresceu com 145 dias e *S.scabra* com 155 dias. A espécie mais tardia foi *S.macrocephala*, florescendo com 200 dias. *S. hamata* é conhecida como a espécie mais precoce do gênero. Em estudos no Jinka Agricultural Research Center na Etiópia os acessos da espécie chegaram a florescer aos 65 dias (Hidosa 2015). Para Simeal et al. (2015), as espécies de *Stylosanthes* que florescem com menos de 120 dias são consideradas ciclo precoce, as que fiorescem entre 121 e 149 dias são tidas como de ciclo médio e de ciclo tardio são aquelas que apresentam florescimento a partir dos 150 dias.

*S. hamata* utilizada em nossos estudos foi coletada em Petrolina, com precipitação média de 324,8 mm anual. Segundo Queiroz et al. (2000), as



populações de *Stylosanthes* do Sertão foram selecionadas para o florescimento precoce, por ser esta uma região cujo período de chuvas é mais curto e desuniforme, em relação às outras duas regiões de Pernambuco.

Observou-se correlações significativas e positivas a 1% probabilidade pelo teste t entre as variáveis morfológicas, diâmetro do caule X diâmetro do folíolo central, diâmetro do caule X massa seca da raiz, massa seca das folhas X relação folha haste, comprimento do apêndice da semente X comprimento da semente e comprimento da estípula X largura da estípula. Foram significativas e negativas, massa de nódulos X comprimento da semente e comprimento da inflorescência X largura da semente (Tabela 3).

As correlações permitem agrupar variáveis de interesse, de forma que a determinação das associações entre os grupos possibilitem a seleção indireta de caracteres (Cruz 2012) e, portanto, fornecem informações valiosas para seleção de ideótipos em programas de melhoramento para *Stylosanthes* sp.

As correlações das características morfológicas com as características climáticas do local de coleta apresentaram os seguintes resultados: a 5% de probabilidade, diâmetro do caule X evatranspiração potencial e diâmetro caule X precipitação foram significativas com sinal negativo (Tabela 4). Já massa seca das raízes também foi significativo com evapotranspiração potencial, mas com sinal positivo.

Barros et al. (2005) concluíram que a variabilidade genética de espécies de *Stylosanthes macrocephala* está relacionada a diferentes regiões de coleta. No entanto, a relação entre o ambiente de coleta a diversidade genética em *Stylosanthes* spp. mensuradas por caracteres morfológicos não foi constatada por Oliveira et al. (2016). Nossos estudos assim como nos estudos do último autor citado, trabalhamos com várias espécies. Entre essas espécies está *S. scabra* que tem ampla ocorrência e em diferentes condições, contribuindo paradiminuir a significância entre a coracterísticas morfológicas das espécies com as características climáticas dos locais de coleta.

**Tabela3.** Estimativa de correlações de Pearson entre caracteres morfológicos em diferentes espécies de *Stylosanthes* coletados no estado de Pernambuco.

	AP	DC	DF	CF	MSF	MSH	Rel. F/H	MSR	MN	LI	CI	Lest	Cest	Capen	Lsem	Csem	Iflo
AP	1	-0.05	-0.04	0.57	0.25	0.68	0.26	0.24	0.32	-0.05	0.18	0.37	0.20	-0.38	0.02	-0.25	0.45
DC		1	0.85**	-0.17	0.73*	0.62	0.60	0.87**	0.62	0.45	-0.48	0.09	0.36	-0.58	0.56	-0.74*	0.25
LF			1	0.00	0.82*	0.66	0.70	0.68	0.63	0.78*	-0.42	0.55	0.75*	-0.70	0.60	-0.75*	0.56
CF				1	0.46	0.42	0.60	0.10	0.25	-0.20	0.40*	-0.05	-0.55	0.01	-0.56	0.01	0.70
MSF					1	0.79*	0.95**	0.80*	0.82*	0.40	0.20	0.40	0.65	-0.65	0.14	-0.77*	0.66
MSH						1	0.76*	0.68	0.60	0.42	-0.11	0.54	0.65	-0.80*	0.41	-0.71*	0.68
Rel. F/H								0.66	0.72*	0.27	0.19	0.34	0.59	-0.43	-0.05	-0.60	0.62
MSR								1	0.80*	0.18	-0.19	0.36	0.31	-0.72*	0.31	-0.82*	0.21
MN									1	0.24	-0.12	0.28	0.32	-0.69	0.12	-0.93**	0.30
LI										1	-0.60	0.82*	0.76*	-0.57	0.78*	0.48	0.42
CI											1	-0.20	0.01	0.35	-0.86**	0.41	0.23
Lest.												1	0.84**	-0.58	0.47	-0.39	0.71*
Cest													1	-0.62	0.39	-0.41	0.83*
Capen														1	-0.57	0.85**	-0.32
Lsem															1	-0.43	0.11
Csem																1	-0.24
Iflo																	1

AP - Altura da planta (cm), DC - Diâmetro do caule (mm), LF - Largura do folíolo central (mm), CF - Comprimento do folíolo central (mm), MSF - Massa seca das folhas (g), MSH - Massa seca das hastes (g), RelF/H- Rlação folha hastes, MSR - massa seca de raiz (g), MN - Massa de nódulos (mg), LI - Diâmetro da inflorescência (mm), CI-Comprimento da fol da inflorescência (mm), Lest.- Largura da estípula (mm), Cest - Comprimento da estípula (mm), Capen - Comprimento do apêndice da semente (mm), Lsem - Largura da semente (mm), Csem - Comprimento da semente (mm), Ifl - Início do florescimento (dias). \*\* \*: Significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste t.

**Tabela4.** Estimativa de correlações de Pearson entre caracteres morfológicos e características climáticas do local de coleta para diferentes espécies de *Stylosanthes* em Pernambuco.

	Alt.	Prec.	Tmáx.	Tmín.	Ev
AP	0.62	0.26	-0.03	-0.39	0.21
DC	0.18	-0.72*	0.35	-0.02	-0,08*
DF	0.04	-0.36	0.11	-0.27	-0.54
CF	-0.16	0.64	-0.01	0.03	0.01
NR	-0.24	0.05	-0.63	-0.55	0.20
MSF	0.10	-0.41	0.22	-0.12	-0.58
MSC	0.44	-0.22	0.25	-0.29	-0.39
MSR	0.34	-0.67	0.61	0.15	0.82*
NN	0.52	-0.22	0.21	-0.18	-0.40
LI	0.07	0.18	-0.26	-0.59	-0.01
CI	-0.47	0.01	0.14	0.49	0.35
Lest	0.17	0.05	-0.01	-0.30	-0.17
Cest	-0.17	0.07	-0.41	0.20	0.35
Capen	-0.48	-0.04	0.01	-0.45	-0.15
Isem	0.35	0.22	-0.27	0.26	0.43
Iflo	-0.56	0.04	-0.25	-0.41	-0.05
Pflo	-0.12	0.21	-0.27	-0.25	0.43
Inf	-0.16	0.24	-0.26	-0.41	-0.11
Alt	1	0.22	-0.40	-0.50	0.17
Prec		1	-0.62	-0.58	0.94**
Tmax			1	0.78*	-0.75*
Tmim				1	-0.56
EV					1

AP - Altura da planta (cm), DC - Diâmetro do caule (mm), LF - Largura do folíolo central (mm), CF - Comprimento do folíolo central (mm), NR - Número de ramos, MSF - Massa seca das folhas(g), MSC - Massa seca do caule (g), MSR - massa seca de raiz (g), MN - Massa de nódulos (mg), LI - Diâmetro da inflorescência (mm), CI-Comprimento da fol da inflorescência (mm), Lest.- Largura da estípula (mm), Cest - Comprimento da estípula (mm), Capend - Comprimento do apêndice da semente (mm), Lsem - Largura da semente (mm), Csem - Comprimento da semente (mm), Ifl - Início do florescimento (dias), Pfl - Pleno florescimento (dias), Prec - Precipitação anual (mm/ano), Tma - Temperatura máxima (°C), Tmin - Temperatura mínima (°C) e Ev - Evapotranspiração real (mm/ano). Significativo a 1(\*\*) e 5%(\*) de probabilidade pelo teste t.

Foi possível reunir os oito genótipos em três grupos pelo método de Tocher, assim como pelo método UPGMA, (Figura 1). O primeiro grupo foi formado pelos dois acessos das espécies *S. scabra*, sendo esses os genótipos mais similares entre todos. No mesmo grupo em uma ramificação mais próxima ficou *S. seabrana* e em ramificações isoladas o acesso 8, que ainda não possui

identificação de espécie e *S. macrocephala*. O segundo grupo foi formado pelas espécies, *S. hamata* e *S. humilis*. O último grupo foi formado pelo isolamento da espécie *S. angustifolia*, sendo caracterizada por apresentar menor diâmetro e maior comprimento de folíolos.

## Conclusões

Os marcadores morfológicos permitiram constatar a existência de variabilidade entre as espécies do gênero *Stylosanthes* que ocorrem de forma espontânea em Pernambuco. As características climáticas dos locais de coletas são informações importantes a serem anexadas às fichas de identificação de genótipos nas coleções de germoplasma e podem contribuir para futuras decisões na utilização desses genótipos em programas de melhoramento.

## Referências

Benicio CA (2015) **Produção de forragem do capim-buffel consorciado com *Stylosanthes scabra* sob diferentes espaçamentos**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 93f.

Barros AM, Faleiro FG, Karia CT, Shiratsuchi LS, Andrade RP and Lpes GKB (2005) Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesq. Agropec. Bras.** 40:899-909.

Calles T and Schultze-Kraft R (2016) New species, nomenclatural changes and recent taxonomic studies in the genus *Stylosanthes* (Leguminosae): An update. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales** 4:122–128.

Costa NM (2006) **Revisão do Gênero de *Stylosanthes* Sw.** Tese de Doutorado, programa de pós-graduação em Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Costa LC, Sartori ALB and Pott A (2008). Estudo taxonômico de *Stylosanthes* em Mato Grosso do Sul. **Rodriguésia**. 59:547-572.

Cruz CD (2012) **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Editora da UFV, Viçosa, 514p.

Cruz CD (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum** 35(3):271-276.

Falco JS, Fernandes CD, Verzignassi JR, Mallmann G, Queiróz CA, Chagas HA, Batista MV and Quetez FA (2016) Reação de genótipos de *Stylosanthes capitata* à antracnose. **Summa Phytopathologica** 42(2):140-148.

Figueiredo UJ, Nunes, JAR and Valle CB (2012) Estimation of genetic parameters and selection of *Brachiaria humidicola* progenies using a selection index. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 12(4):237-244.

Fortuna-Peres AP, Silva MJ and Tozzi AMGV (2011) *Stylosanthes* Papilionideae (Leguminosae- Papilionoideae- Dalbergiae). **Rodriguésia** 62(3):615-628.

Freitas, A.D.S, Menezes RSC, Silva TO and Fraga VS (2011) Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40(9):1856-1861.

Gama TC, Volpe E, Lempp B and Galdeia EC (2013) Recuperação de pasto de capim-braquiária com correção e adubação de solo e estabelecimento de leguminosas. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal** 14(4):635-647.

Guimarães Vieira IC and Martins OS (1991) Caracterização morfológica do fruto e semente de *Stylosanthes angustifolia* vog. (Leguminosae-Papilionoideae) e sua relação com a germinação. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Serie botânica** 7(2): 287-300

Hidosa D (2015) Evaluation the Adaptability of *Stylosanthes hamata*, *Stylosanthes guinea* and *Desmodium uncinatum* species on Station of Jinka Agricultural Research Center, Jinka , Ethiopia. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare** 5(19).

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>> Acesso em: 15 de Março 2017.

Martuscello JA, Braz TGS, Silveira JM, Simeão RM, Ferreira MR, Noronha D and Cunha FV (2015) Diversidade genética em acessos de *Stylosanthes capitata*. **Boletim de Indústria Animal**. 72(4)284-289.

Maass BL and Mannetje L (2002) *Stylosanthes seabrana* (Leguminosae: Papilionoideae), a new species from Bahia, Brazil. **Novon** 12:497–500.

Marchese A, Maluf WR, Gonçalves Neto AC, Gonçalves RJS and Gomes LAA (2010) Seleção de clones de batata-doce resistentes a *Meloidogyne incognita* raça 1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 45(9): 997-1004.

Mendonça E S, Guimarães P, Moura GP and Melo W (2017). Biological Nitrogen Fixation by Legumes and N Uptake by Coffee Plants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 41: 1-10.

Miranda SB (2013) **Divergência morfológicas em *Stylosanthes* spp. Ocorrentes em Pernambuco**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 56p.

Monteiro LC, Verzignassi JR, Barrios SCL, Valle CB, Fernandes CD, Benteo GL, Libório CB (2016) *Brachiaria decumbens* intraspecific hybrids: characterization and selection for seed production. **Journal of Seed Science** 38(1):62-67.

Oliveira RS, Queiróz MA, Romão MA, Almeida AS, Mistura P and Queiróz P (2015) Genetic parameters in *Stylosanthes* using different statistical methods. **African Journal of Agricultural Research** 10(46):4222-4230.

Oliveira RS, Queiróz MA, Romão RS, Silva, GC and Brasileiro BP (2016) Genetic diversity in accessions of *Stylosanthes* spp. using morphoagronomic descriptors. **Caatinga** 29(1):101-112.

Resende RMS, Resende MDV and Laura VA (2006) Genotypic evaluation of accessions and individual selection in *Stylosanthes* spp. by simulated BLUP method. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 6:253-260.

Queiroz RM, Marcon G, Anunciação Filho GJ, Matos, VP, Cisneiros RA (2000) Estratégias adaptativas de populações de *Stylosanthes scabra* provenientes de três regiões ecogeográficas de Pernambuco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 5(2):320-325.

Santos-Garcia MO, Silva GO, Sasaki RP, Ferreira TH, Resende RSM, Chiari L, Karia CT, Carvalho MA, Faleiro FG, Zucchi MI and Souza AP (2012) Using genetic diversity information to establish core collections of *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala*. **Genetics and Molecular Biology** 35:847-861.

Santana Neto JA, Oliveira VS, Valença RL (2015) Leguminosas adaptadas como alternativa alimentar para ovinos no semiárido – revisão. **Revista de Ciências Agroveterinárias** 14(2):191-200.

Simeão RM, Ramos AKB, Martuscello JA and Braz TGSB (2015) **Descritores morfológicos mínimos e normas para condução de ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade em *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. e *Stylosanthes capitata* Vogel.** Embrapa Gado de Corte, Campo Grande-MS.

Stace HM and Edye LA (1984) **The biology and agronomy of *Stylosanthes*.** Academic Press, Sidney.

Teixeira VI, Dubeux júnior JCB, Santos MVF, Lira Júnior MA, Lira MA, Silva HMS (2010) Aspectos agrônômicos e bromatológicos de leguminosas forrageiras no nordeste brasileiro. **Archivos de Zootecnia** 25(226):245-254.

Valle CB, Jank L and Resende RMS (2009) O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista ceres** 56(4):460-472.

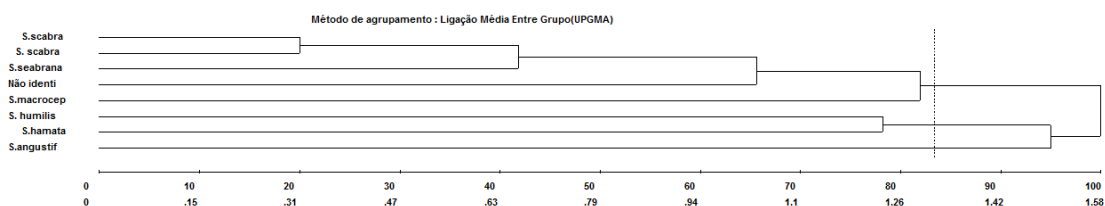


Figura 1. Dendrograma gerado pelo método UPGMA utilizando a distância de Mahalanobis entre *Stylosanthes* spp. coletadas no estado de Pernambuco.



## CAPÍTULO IV

---

### **Diversidade genética em populações naturais de *Stylosanthes scabra* usando marcadores ISSR**

Artigo a ser enviado para publicação na  
revista Genetics and Molecular Research

## **Diversidade genéticas em populações naturais de *Stylosanthes scabra* usando marcadores ISSR**

### **Resumo**

A diversidade genética é um insumo para o melhoramento genético e funciona como fonte de genes para novas cultivares. *Stylosanthes scabra* é uma leguminosa que vem sendo utilizada em pastagens, apresentando importância econômica em regiões tropicais e subtropicais. Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em estudos de populações. O objetivo do trabalho foi avaliar a distribuição da diversidade genética de *S. scabra* no semiárido Pernambuco entre e dentro de populações, a partir de marcadores moleculares ISSR. Quatro populações naturais de *S. scabra* localizadas nos municípios de Santa Cruz do Capibaribe, Floresta, Sertânia e Petrolina foram utilizadas. Foram selecionados 7 primers ISSR para amplificação e as análises em 75 indivíduos. Foi amplificado um total de 88 bandas com uma porcentagem de 95,27% de polimorfismo em nível de espécie. A AMOVA revelou que 40,0% da variação genética total encontra-se dentro de populações enquanto 60,0% entre populações. A diferenciação populacional foi 0,332 e o número de migrantes por geração foi de 0,5. A análise de agrupamento confirmou um grande nível de diferenciação entre as populações. Os marcadores ISSR deste estudo foram eficientes para a quantificação da diversidade genética em *S. scabra*. A espécie apresenta maior variabilidade entre populações do que dentro das populações. As populações com maior variabilidade foram as de Santa Cruz do Capibaribe e de Petrolina. Essa variabilidade será de grande utilidade em futuros programas de melhoramento para a espécie.

**Palavras-chaves:** marcadores moleculares, leguminosas, variabilidade.

## **Genetic diversity in natural populations of *Stylosanthes scabra* using ISSR markers**

### **Abstract**

Genetic diversity is an input for genetic improvement and functions as a source of genes for new cultivars. *Stylosanthes scabra* is a legume that has been used in pastures, presenting economic importance in tropical and subtropical regions. Molecular markers have been widely used in population studies. The objective of this work was to evaluate the distribution of the genetic diversity of *Stylosanthes scabra* in the semi - arid Pernambuco among and within populations, by molecular markers ISSR. Four natural populations of *S. scabra* located in the municipalities of Santa Cruz do Capibaribe, Floresta, Sertânia and Petrolina were used. We selected 7 ISSR primers for amplification and the analyzes in 75 individuals. A total of 88 bands were amplified with a percentage of 95.27% polymorphism at the species level. AMOVA revealed that 40.0% of the total genetic variation is within populations while 60.0% among populations. The population differentiation of 0.332 and the number of migrants per generation was 0.5. Grouping analysis confirmed a high level of differentiation between populations. The ISSR markers of this study were efficient for the quantification of genetic diversity in *S. scabra*. The species has greater variability among populations than within populations. The greatest variability was found in the populations of Santa Cruz do Capibaribe and Petrolina. This variability will be of great use in future breeding programs for the species.

**Key words:** Molecular markers, Legumes, Variability.

## Introdução

A escassez de pastagens nas épocas secas no semiárido nordestino tem-se constituído num forte estímulo para que pesquisadores despertem para a necessidade de estudar as plantas forrageiras nativas (Santana Neto et al. 2015). Leguminosas forrageiras geralmente contêm altos teores de proteínas, minerais e vitaminas (Idowu et al. 2013). Assim, são frequentemente utilizados como fontes de proteína para corrigir a deficiência das pastagens naturais (Tufarelli et al. 2010).

Incorporando leguminosas forrageiras na dieta de ruminantes como alimento complementar tem-se observado melhora do consumo de ração e conversão alimentar (Pen et al. 2013). A inclusão dessas leguminosas na ração dos animais, também ajuda a reduzir os custos com concentrado (Olafadehan et al. 2014). Entre estas leguminosas, está o gênero *Stylosanthes*, o qual possui ampla adaptação e resistência a fatores biótico e abióticos (Pangga et al. 2004, Nagaich et al. 2013), com espécies eretas e prostradas, com predomínio de espécies perenes (Costa et al. 2008). Uma das vantagens dessa leguminosa em relação às demais é a capacidade de desenvolver-se em solos com baixos níveis de nutrientes disponíveis, particularmente o Fósforo (P) (Gonzalez et al. 2000). *Stylosanthes* é capaz de fixar o Nitrogênio do ar e disponibilizar para as culturas (Mendonça et al. 2017) e também é indicado para recuperação de pastagens degradadas (Fabrice et al. 2015).

No Brasil, ocorrem 25 espécies do gênero *Stylosanthes*, sendo que 13 delas são encontradas apenas em território nacional (Santos-Garcia et al. 2011). *S. scabra* é uma espécie com ampla ocorrência na América do Sul (Calles and Schultze-kraft 2016). Do gênero, é a espécie mais comum nos estados do Nordeste, com ocorrências registradas em diferentes condições ambientais (Oliveira et al. 2016). Fora do Nordeste, a espécie ocorre em Goiás, Minas Gerais, São Paulo (Brandão and Costa 1979), Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Costa et al. 2008).

*Stylosanthes scabra* possui alguns cultivares comerciais já lançadas, como a cultivar Seca, lançadas em parceria entre o *International Center for Tropical Agriculture* (CIAT) na Colômbia e o *Commonwealth Scientific and*

*Industrial Research Organization* (CSIRO) na Austrália, que tem se destacado pela sua capacidade de adaptação e desempenho agrônômico sob condições de sequeiro no clima sub-tropical. O cultivar Seca contém mais de 17% de proteína bruta com baixo nível de tanino (Mpanza et al. 2013). De acordo com Akinlade et al. (2008), a *S. scabra* pode obter uma produção de MS de até 1,97 t/ha.

Para explorar todo potencial de *Stylosanthes scabra* é crucial conhecer a diversidade genética que existe na espécie. Desta forma, estudos de diversidade genética de populações são importantes como suporte a programas de melhoramento de plantas (Araújo et al. 2016). Podem mensurar a variabilidade genética disponível no banco de germoplasma, assim como determinar a necessidade de busca por novos acessos (Ambiel et al. 2010).

Conhecer a diversidade genética das espécies dentro e entre as populações também pode gerar informações para a conservação genética *in situ* das populações naturais da espécie (Gonçalves et al. 2010). A existência de variabilidade nas populações naturais permite a evolução de novas combinações genéticas (Medrano et al. 2014). Assim, apresenta maior capacidade de evolução e adaptação às mudanças nas condições ambientais, que são características importantes não só para a preservação, mas também para o melhoramento genético (Srihari et al. 2013).

Na caracterização da diversidade genética, basicamente se utilizam quatro tipos de marcadores: morfológicos, bioquímicos, moleculares e citológicos. Os moleculares apresentam a particularidade de poderem ser utilizados para a análise em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (Martuscello et al. 2015, Vieira et al. 2015). Entre os marcadores moleculares, os ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*) destacam-se entre outros por não necessitar de informação prévia da seqüência de DNA e apresentar procedimentos laboratoriais com boa taxa de transferibilidade (Dias et al. 2015).

ISSR são marcadores moleculares semiarbitrários, amplificados por PCR em presença de um oligonucleotídeo complementar para um microssatélite designado (Nilkanta et al. 2017). No gênero *Stylosanthes*

marcadores ISSR foram considerados mais eficientes que marcadores RAPD e STR para detectar variabilidade genética (Nagaich and Chandra 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição da diversidade genética de quatro populações de *S. scabra* no semiárido Pernambuco a partir de marcadores moleculares ISSR.

### Material e métodos

As coletas foram realizadas no mês de setembro de 2015. Amostras de 76 plantas de *S. scabra* foram utilizadas a partir de 4 populações naturais na região semiárida do estado de Pernambuco, Brasil (Tabela 1) (Figura 1). Cada população foi representada por 19 indivíduos. Para extração de DNA as folhas jovens de cada planta foram acomodadas em caixas de isopor e transportados para o Laboratório.

**Tabela 1.** Identificação de populações de *Stylosanthes scabra* estudadas no estado de Pernambuco.

Populações	Coordenadas Geográficas		Características das populações
	Maior e menor Latitude	Maior e menor Longitude	
Santa Cruz do Capibaribe Floresta	08°21'01" a 08°21'46"	40°20'19" a 40°21'52"	Pasto
Sertânia	08°31'77" a 08°43'24"	38°28'06" a 38°29'22"	Caatinga às margens de rodovia
Petrolina	08°00'52" a 08°32'35"	36°27'58" a 37°36'28"	Caatinga às margens de rodovia
	08°58'32" a 08°59'03"	40°16'12" a 40°45'16"	Plantas às margens de canal de irrigação

O DNA foi extraído seguindo a metodologia ajustada para esta espécie por Santos-Garcia et al. (2012). Posteriormente, foi quantificado por comparação com padrões do lambda (Invitrogen) de concentrações conhecidas

em (100, 200 e 500 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) em gel de agarose 0,8%. A pureza das amostras de DNA foi confirmada em espectrofotômetro sob a luz UV (260/280 nm).

Foram utilizados sete primers de ISSR (Tabela 2). As reações de amplificação foram feitas para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 25ng de DNA, uma unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10mM de Tris-HCL (pH 8,0), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,25  $\mu\text{M}$  de cada dNTPs e 0,8  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeos. As amplificações do DNA foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 4 min a 94°C (desnaturação inicial); seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 50°C (anelamento) e 90 segundos a 72°C (extensão), extensão final por 7 minutos a 72°C (Nagaich et al. 2009).

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 2%, corados com Syber Gold (Invitrogen), utilizando-se o marcador de 100 pb (Invitrogen), sendo visualizados sob luz ultravioleta e registrados em fotodocumentador digital Vilber Lourmat. Os polimorfismos foram tabulados de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de bandas. Por meio do Software GenAlex 6,5 (Peakall et al., 2012), foi estimada: número de alelos efetivos ( $n_e$ ), Índice de Shannon (I), heterosigosidade total ( $H_T$ ), heterosigosidade dentro das populações ( $H_s$ ), diferenciação genética entre populações ( $G_{st}$ ) e número de migrantes na população ( $N_m$ ).

A identidade genética e a distância genética entre populações foram também computadas usando o modelo apresentado por Nei (1978). A análise de variância molecular (AMOVA) também foi utilizada para revelar a distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações. Nesta análise, a diversidade genética total foi partida em dois níveis hierárquicos distintos: diferença entre populações e entre indivíduos dentro de população. O programa "Structure" (Pritchard et al. 2000), baseado em estatística Bayesiana foi utilizado para inferir o número de grupos ( $k$ ). O estudo da correlação entre a distância geográfica e distância genética entre as populações de *S.scabra* foi feita usando o programa Genes utilizando 9999 permutações (Cruz 2013).

## Resultados e Discussão

Os números de amplicons em segregação variaram de 9 para o primer UBC808 a 16 loci para UBC810. Esse último além de apresentar 16 loci também alcançou 100% de polimorfismo (Tabela 2). Os perfis de eletroforese do primer encontra-se na Figura 2. Os valores encontrados no presente estudo estão de acordo com os mencionados na literatura para marcadores dominantes em *Croton tetradenius* (Almeida-Pereira et al. 2017) e em *Mimosa caesalpiniaefolia* (Araújo et al. 2016).

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos de ISSR utilizados em populações de *Stylosanthes scabra*

Oligonucleotídeos	Sequência	Nº de loci	Polimorfismo (%)
UBC 1	ACACACAACACACACT	10	100,0%
UBC 2	GAGSGGAGAGAGAGAT	12	100,0%
UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGGC	9	100,0%
UBC 810	CTTCATTTCACTTCA	16	100,0%
UBC 813	GAGAGAGAGAGAGAGAA	15	95,5%
UBC 879	CTTCATTTCACTTCA	12	100,0%
UBC 888	BDBCACACACACACA	14	71,42%
<b>Total</b>		88	95,27%

Os valores para  $N_e$ ,  $H_T$  e  $I$  ao nível de espécie também foram registrados em, 1.237, 0.173 e 0.304, respectivamente (Tabela 3). Esses resultados demonstram elevado nível de diversidade genética. Já a diversidade dentro de cada população foi considerada baixa. O número efetivo de alelos ( $N_e$ ) variou de 1.146 a 1.248. A Heterosigosidade intrapopulacional ( $H_s$ ) se estendeu de 0.086 a 0.140 e o índice de informação de Shannon ( $I$ ) variou de 0.129 para 0.199. Nilkanta (2017), trabalhando com ISSR em *Melocanna bacífera*, considerou seus resultados elevados com valores para  $N_e$ ,  $H$ , e  $I$  de 1.275, 0.139 e 0.3218, também a nível de espécie.



Considerando as quatro populações de nossos estudos, as populações de Santa Cruz do Capibaribe e Petrolina apresentaram a maior Diversidade genética intrapopulacional ( $H_s$ ). A população de Petrolina estava localizada às margens de um canal de irrigação, os animais vão beber água no local e em consequência disso possibilitando transporte de sementes. Já a população de Santa Cruz estava localizada em um pasto e como os animais mudam de um pasto para o outro, também podem transportar sementes.

O coeficiente de diferenciação genética nesse estudo foi de 0,334 considerando todas as populações. De acordo com Lu et al. (2005), valores de 0,30 representam alto grau de diferenciação entre populações, sugerindo baixas taxas de fluxo gênico entre as populações. De modo oposto, quando ocorre alto nível de fluxo gênico não é possível diferenciar as populações (Ambiel et al. 2010). Segundo Collevatti et al. (2013), o coeficiente de diferenciação genética é um dos vários parâmetros genéticos entre as populações que deve ser considerado para definir a relação das espécies com o ambiente.

**Tabela 3.** Parâmetros de diferenciação genética em quatro populações de *S. scabra* no Estado de Pernambuco.

Pop	Ne	I	Hs	H <sub>T</sub>	D <sub>ST</sub>	N <sub>M</sub>
<b>Santa Cruz do Capibaribe</b>	1.241	0.212	0.141			
<b>Floresta</b>	1.235	0.206	0.138			
<b>Sertânia</b>	1.150	0.134	0.089			
<b>Petrolina</b>	1.242	0.197	0.136			
<b>Média</b>	1.217	0.187	0.126			
<b>Total</b>	1.434	0.445		0.281	0.334	0.500

Número de alelos efetivos ( $N_e$ ), Índice de Shannon ( $I$ ), Diversidade genética intrapopulacional ( $H_s$ ), Diversidade genética total ( $H_T$ ), Coeficiente de diferenciação populacional ( $D_{ST}$ ), Estimativa número de migrantes na população ( $N_m$ ).

O Número de migrantes foi de apenas 0,5 indivíduos por geração, reafirmando o isolamento das populações. Atrelado ao fato de *S. scabra* serem predominantemente autógamas, esse baixo número de migrantes descarta a ocorrência de relevante migração genética presente no processo de diferenciação das populações (Zamora et al. 2015). A distância genética entre

as populações variou de 0,244 entre as populações de Sertânea e Santa Cruz do Capibaribe a 0,505 entre as populações de Santa Cruz do Capibaribe e Petrolina (Tabela 4). As populações mais próximas foram as que apresentam a menor distancia genética, assim como as populações mais distantes geograficamente também apresentaram maior distância genética.

**Tabela 4.** Distancia geográfica (parte superior da tabela) e distancia genética (parte inferior da tabela I) para quatro populações de *S. scabra* em Pernambuco

	<b>Santa Cruz do Capibaribe</b>	<b>Floresta</b>	<b>Sertânia</b>	<b>Petrolina</b>
<b>Santa Cruz do Capibaribe</b>		345 Km	161 Km	624 Km
<b>Floresta</b>	0.466		183 Km	278 Km
<b>Sertânia</b>	0.244	0.275		464 Km
<b>Petrolina</b>	0.505	0.402	0.325	

A correlação matricial entre distância genética e distância geográfica foi significativo segundo teste de Mantel a 1% de probabilidade. No entanto, nem sempre é comum encontrar na literatura uma alta correlação entre distâncias genéticas e geográficas (Jamnadas et al 2006; Vigna et al 2011). Segundo Zhao et al. (2012), fatores ambientais, sistema de acasalamento, o tamanho da população e o fluxo genético mostram-se mais importantes que a distancia geográfica na diferenciação das populações.

A população de Petrolina apresentou o maior número de *amplicons* privados (Figura 3). Esta é a população com maior variabilidade, o que contribui para o aparecimento dos referidos fragmentos de DNA (Szpiech and Rosenberg, 2011). Segundo Elstrand (2014), a ocorrência de bandas privadas está relacionada ao número médio de migrantes trocados por gerações entre as populações e a presença delas pode indicam redução de fluxo gênico.

Os resultados obtidos pela AMOVA mostraram que a maior parte da variação genética (60%) foi distribuída entre as populações e 40% foi distribuído dentro das populações (Figura 4). As espécies com autofecundação exibem maior diversidade genética entre as populações (Buzatti et al. 2012). Já

para plantas com elevadas taxas de alogamia é diferente. Em estudo realizado por Santos-Garcia et al. (2012) com marcadores microssatélites, *Stylosanthes capitata* que pode apresentar alogamia acima de 20%, não apresentou correlação entre a distância genética e os locais de coletas. No entanto, deve-se ressaltar que o estudo citado considerou poucos acessos por local de coleta.

A menor diversidade genética dentro do que entre as populações, indicam a necessidade crescente de conservação e proteção de todas as populações naturais existentes na região. Visando explorar o máximo da diversidade em futuras coletas, para *S. scabra* não é necessário coletar muitos indivíduos por populações e sim coletar poucos indivíduos, mas em populações diferentes.

A disposição das populações pode ser visualizada pela distribuição gráfica da variabilidade das espécies no programa Structure (Figura 5). Assim, quatro grupos também foram formados entre as amostras coletadas. Os grupos seguiram as divisões por locais de coletas, diferenciando as quatro populações. Para Chandra et al. (2009), esse agrupamento ocorre pelo isolamento geográfico e devido a autogamia em *S. scabra*. Nesses casos os genótipos superiores tendem a subressair e povoar a população com o maior número de descendentes, aumentando a similaridade entre eles. Barros et al. (2005) também observaram uma tendência de separação por bacias hidrográficas para acessos de *Stylosanthes* coletados nos estados da Bahia e de Minas Gerais.

As análises Bayesianas mostraram um valor máximo de  $K= 4$ , confirmando a estrutura genética bem definida das quatro populações. Os resultados concordaram com o esperado, pelo baixo de número de migrantes e elevada diferenciação genética entre as populações. Para Rossi et al. (2014), quando o máximo valor de  $K$  coincide com o número de populações e os indivíduos de cada população se encontram agrupados, é sinal de forte estruturação genética das populações. Ou seja, há variabilidade genética intrapopulacional e as quatro localidades de amostragem podem ser de fato reconhecidas como quatro populações distintas.

### **Conclusões**

Marcadores ISSR são informativos para estudos de diversidade genética em *Stylosanthes scabra*, fornecendo um procedimento rápido e de baixo custo. Observou-se maior variabilidade entre populações do que dentro das populações, o que mostra a importância de coletas em diferentes cidades para construção dos bancos de germoplasmas de *S. scabra*. Futuras coletas devem enfatizar os municípios de Santa Cruz do Capibaribe e de Petrolina, buscando explorar a variabilidade do gênero nesses municípios.

## Referencias

Almeida-Pereira CS, Silva AVC, Alves RP, Feitosa-Alcantara RM et al (2017) Genetic diversity of native populations of *Croton tetradenius* Baill. using ISSR markers. *Genetics and Molecular Research* 16 (2):2-12.

Ambiel AC, Machado neto NB, Guaberto LM and VANDERLEI TM (2010). Brachiaria germplasm dissimilarity as shown by RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 10:55-64.

Akinlade JA, Farinu GO and Agboola OO (2008). Nutritive value of four accessions of *Stylosanthes scabra* in the derived savanna zone of Nigeria. *Tropical Grasslands* 42: 120-123.

Araújo FS, Pacheco MV, Vieira FA, Ferrari CB, et al. (2016). ISSR molecular markers for the study of the genetic diversity of *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. *Idesia* 34(3):47-52.

Barros AM, Faleiro FG, Karia CT, Shiratsuchi LS, et al. (2005). Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40:899-909.

Brandão MB and Costa NMS (1979). O gênero ***Stylosanthes*** Swartz no Brasil. Epamig, Minas Gerais, 107p.

Buzatti RSO, Ribeiro RA, Lemos F and Lovato MB (2012). Fine-scale spatial genetic structure of *Dalbergia nigra* (Fabaceae), a threatened and endemic tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Genetics and Molecular Biology* 35(4):838-846.

Calles T and Schultze-kraft R (2016). New species, nomenclatural changes and recent taxonomic studies in the genus *Stylosanthes* (Leguminosae): An update. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales* 4:122–128.

Chandra A (2009). Diversity among *Stylosanthes* species: Habitat, edaphic and agro-climatic affinities leading to cultivar development. *Journal of Environmental Biology* 30(4):471-478.

Collevatti RG, Telles MPC, Nabout JC, Chaves LJ, et al. (2013). Demographic history and the low genetic diversity in *Dipteryx alata* (Fabaceae) from Brazilian Neotropical savannas. *Heredity*, 111:97-105.

Costa LC, Sartori ALB and Pott A (2008). Estudo taxonômico de *Stylosanthes* em Mato Grosso do Sul. *Rodriguésia*. 59:547-572.

Cruz CD (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum* 35(3):271-276.

Dias FTC, Bertini CHCM, Silva ANPM and Cavalcanti JJV (2015). Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. *Revista Ciência Agronômica* 46(3):563-572.

Ellstrand NC (2014) Is gene flow the most important evolutionary force in plants? *American Journal of Botany* 101:737-753.

Fabrice CES, Soares Filho CV, Pinto MF, Perri SHV, et al. (2015). Recuperação de pastagens de *Brachiaria decumbens* degradada com introdução de *Stylosanthes* e adubação fosfatada. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 16(4):758-771.

Gonçalves AN, Reis CAF, Vieira FA and Carvalho D (2010). Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região norte de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Botânica*. 3(2):325-332.

Gonzalez LM, Lopez RC, Fonseca I and Ramirez R (2000). Growth stomatal frequency, DM yield and accumulation of ions in nine species of grassland legumes grown under saline conditions. *Pastos y Forrajes* 23(4):299- 308.

Idowu OJ, Arigbede OM, Dele PA, Olanite JA, et al (2013). Nutrients intake, performance and nitrogen balance of West African Dwarf sheep fed graded levels of toasted *Enterolobium cyclocarpum* seeds as supplementa to *Panicum maximum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16:1806–1810.

Jamnadas S, Mace RE, Hiernaux P, Muchugi A and Hanson J (2006) Population genetic responses of wild forage species to grazing along a rainfall gradient in the Sahel: A study combining phenotypic and molecular analyses. *Euphytica* 151:431–445.

Lu Y, Waller DM and David P (2005). Genetic variability is correlated with population size and reproduction in American wild-rice (*Zizania palustris* var. *palustris*, Poaceae) populations. *American Journal of Botany* 92(6):990-997.

Martuscello JA, Braz TGS, Silveira JM, Simeão RM, Ferreira MR, Noronha D and Cunha FV (2015). Diversidade genética em acessos de *Stylosanthes capitata*. *Revista Brasileira de Indústria Animal* 72(4)284-289.

Mendonça E S, Guimarães P, Moura GP and Melo W (2017). Biological Nitrogen Fixation by Legumes and N Uptake by Coffee Plants. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 41:1-10.

Mpanza TDE, Hassen A, Donkin EF and Nzuza WT (2014). Relative preference for, palatability and intake of *Stylosanthes scabra* accessions adapted in Pretoria. *Tropical Grasslands* 2:92–93.

Medrano M, López-Perea E and Herrera CM (2014). Population Genetics Methods Applied to a Species Delimitation Problem: Endemic Trumpet Daffodils (*Narcissus* Section *Pseudonarcissi*) from the Southern Iberian Peninsula (*Pseudonarcissi*) from the Southern Iberian Peninsula. **International Journal of Plant Sciences** 175(14):501-517.

Nagaich D, Tiwari KK, Srivastva N and Chandra A (2013). Assessment of genetic diversity and morpho-physiological traits related to drought tolerance in *Stylosanthes scabra*. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:3127-3136.

Nei M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89(3):583-590.

Nilkanta H, Thougamba A, Tikendra L and Rahaman H (2017). ISSR Marker Based Population Genetic Study of *Melocanna baccifera* (Roxb.) Kurz: A Commercially Important Bamboo of Manipur, North-East India. *Scientifica* 9:1-9.

Olafadehan AO, Adewumi MK and Andokunade AS (2014). Effects of feeding tannin-containing forage in varying proportion with concentrate on the voluntary intake, haematological and biochemical indices of goats. *Trakia Journal of Sciences* 12:73–83.

Oliveira RS, Queiróz MB, Romão RL, Silva GC et al. (2016). Genetic diversity in accessions of *stylosanthes* spp. using morphoagronomic descriptors. *Revista Caatinga* 29:101 – 112.



Pangga IB, Chakraborty S and Yates D (2004). Canopy size and induced resistance in *Stylosanthes scabra* determine anthracnose severity at high CO<sub>2</sub>. *Phytopathology* 94:221–227.

Peakall R and Smouse PE (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.

Peti RJ and Excoffier L (2009). Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution* 24:386-393.

Pen M, Savage DB, Nolan JV and Seng M (2013). Effect of *Stylosanthes Guianensis* supplementation on intake and nitrogen metabolism of Bos Indicus cattle offered a basal diet of mixed rice straw and tropical grass. *Animal Production Science* 53(5):453–45.

Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.

Rossi FS A, Rossi AAB, Dardengo JFE, Brauwers LR, Silva ML and Alexandre Magno Sebbenn (2014) Diversidade genética em populações naturais de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) com uso de marcadores ISSR *Scientia florestales* 42(104):631-639.

Santos-Garcia MO, Resende, RMS, Chiar L, Zucchi MI, et al. (2011). Mating systems in tropical forage *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala* (Albl.) Sw. *Euphytica* 178:185-193.

Santos-Garcia MO, Toledo-Silva G, Sasaki RP, Ferreira TH, et al. (2012). Using genetic diversity information to establish core collections of *Stylosanthes*

*capitata* and *Stylosanthes macrocephala*. *Genetics and Molecular Biology* 35(4):847-861.

Santana-Neto JA, Oliveira VS and Valença RL (2015). Leguminosas adaptadas como alternativa alimentar para ovinos no semiárido. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 14(2):191-200.

Szpiech ZA and Rosenberg NA (2011). On the size distribution of private microsatellite alleles. *Theoretical Population Biology* 80(2):100-113.

Srihari JM, Verma B, Kumar N, Chahota RK, et al. (2013). Analysis of molecular genetic diversity and population structure in sea buckthorn (*Hippophae* spp L.) from northwestern Himalayan region of India. *Journal of Medicinal Plants Research* 7(43):3183-3196.

Tufarelli V, Cazzato E, Ficco A and Andludadio V (2010). Evaluation of chemical composition and invitro digestibility of appennine pasture plants using Yak (*Bos grunniens*) rumen fluid or faecal extract as inoculum source. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences* 23:1587–1593.

Vieira FA, Sousa RF, Silva RAR and Fajardo CG (2015). Diversidade genética de *Copernicia prunifera* com o uso de marcadores moleculares ISSR. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 10(4):525-531.

Zamora TP, Vargas, PO, Sánchez MJ and Cabrera TO (2015). Diversity and genetic structure of the husk tomato (*Physalis philadelphica* Lam.) in Western Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution** 62:141-153.

Vigna IBZ, Jungmann L, Francisco PM, Zucchi MI, Valle CB and Souza AN (2011) Genetic Diversity and Population Structure of the *Brachiaria brizantha* Germplasm. **Tropical Plant Biology** 4:157–169.

Zamora TP, Vargas, PO, Sánchez MJ and Cabrera TO (2015). Diversity and genetic structure of the husk tomato (*Physalis philadelphica* Lam.) in Western Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution** 62:141-153.

Zhao X, Ma WS, Wun X and Milne R (2012) High genetic and low differentiation of *Michelia coriácea* (Magnoliaceae). *International Journal of Molecular Sciences* 13(4):4396–4411.

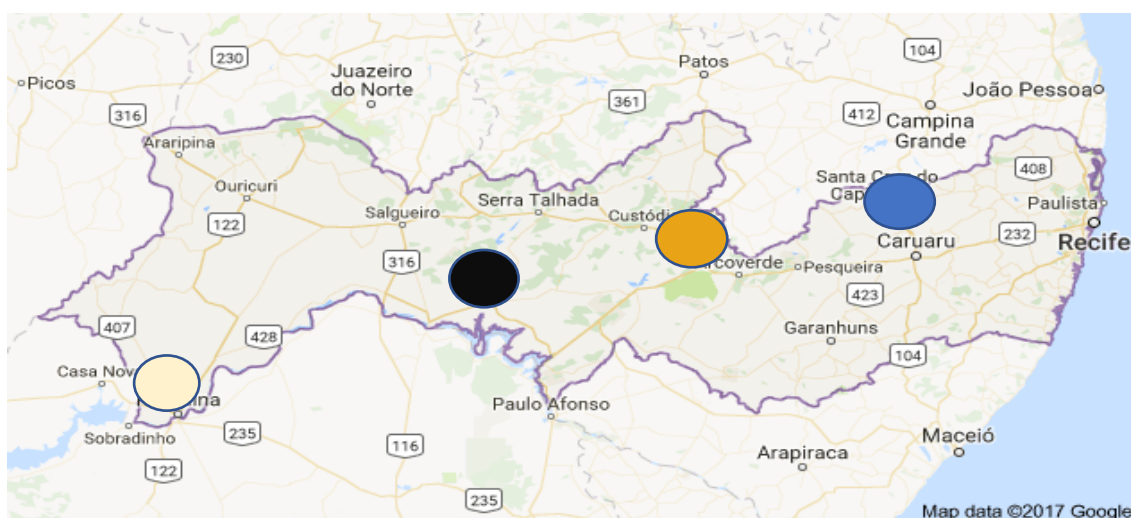
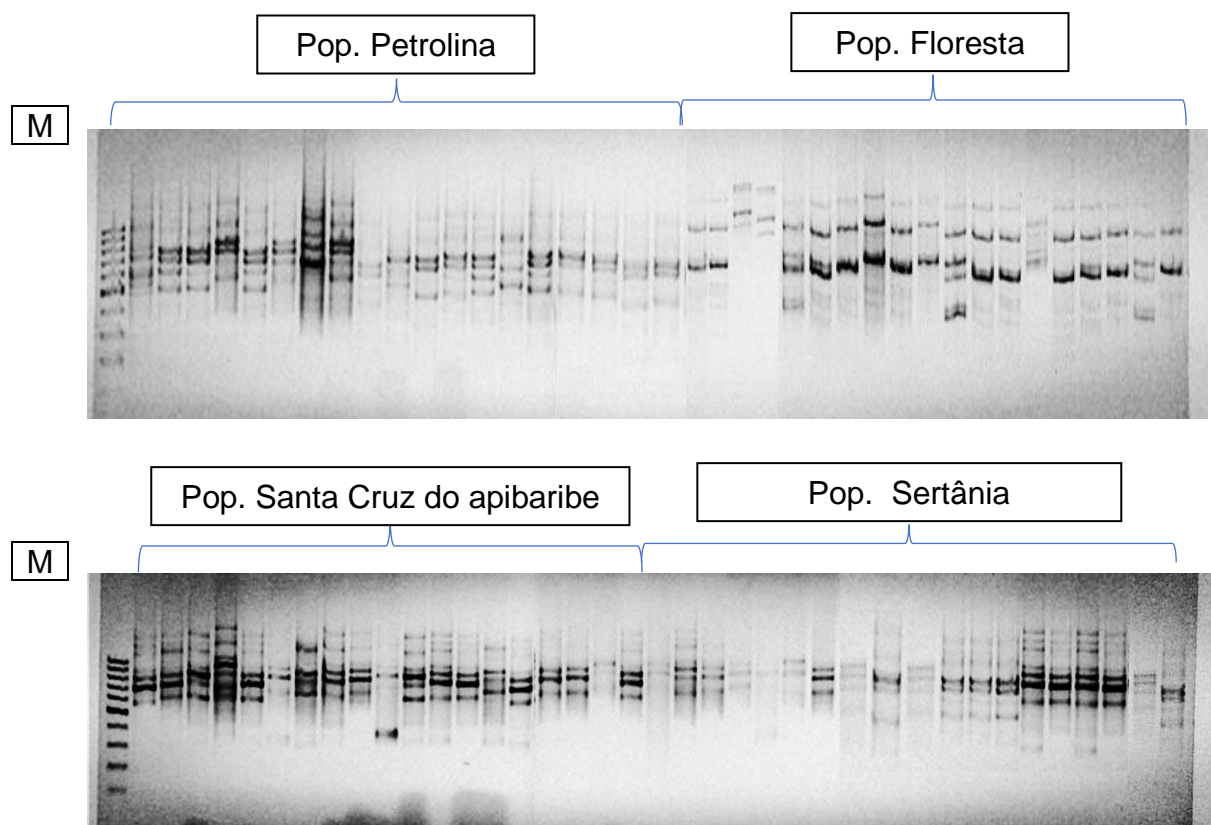
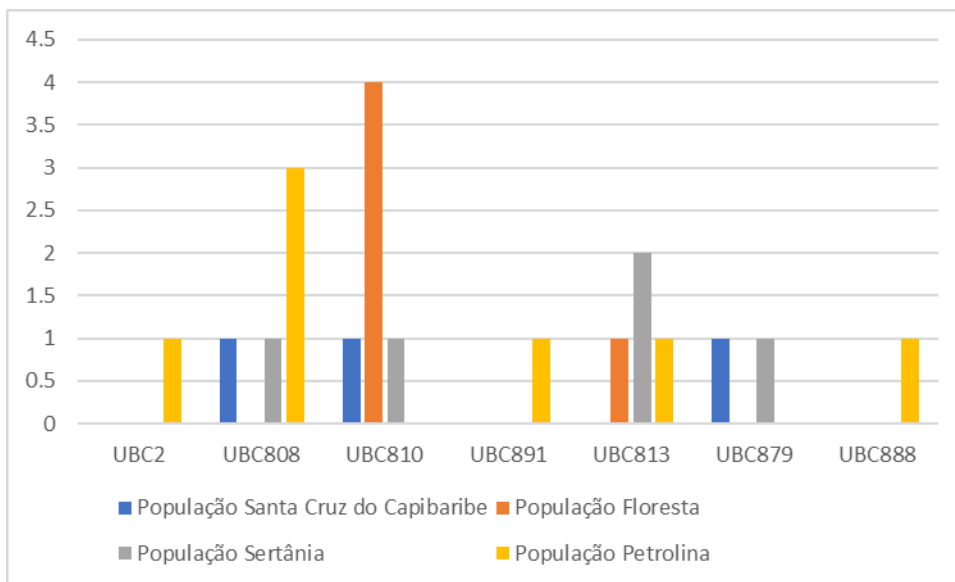


Figura 1. Locais de coleta de populações de *Stylosanthes scabra* no estado de Pernambuco.

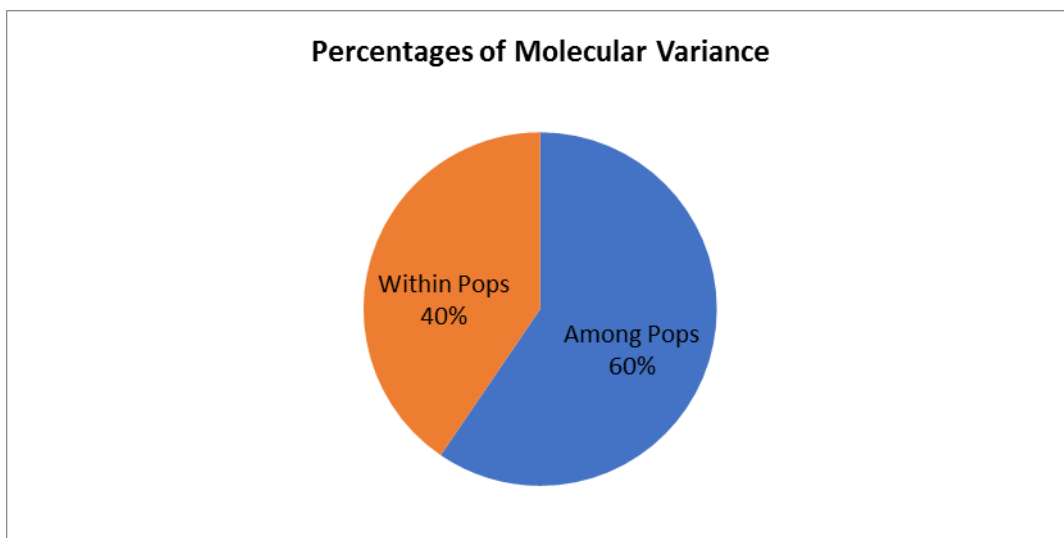
- Santa Cruz do Capibaribe
- Floresta
- Sertânia
- Petrolina.



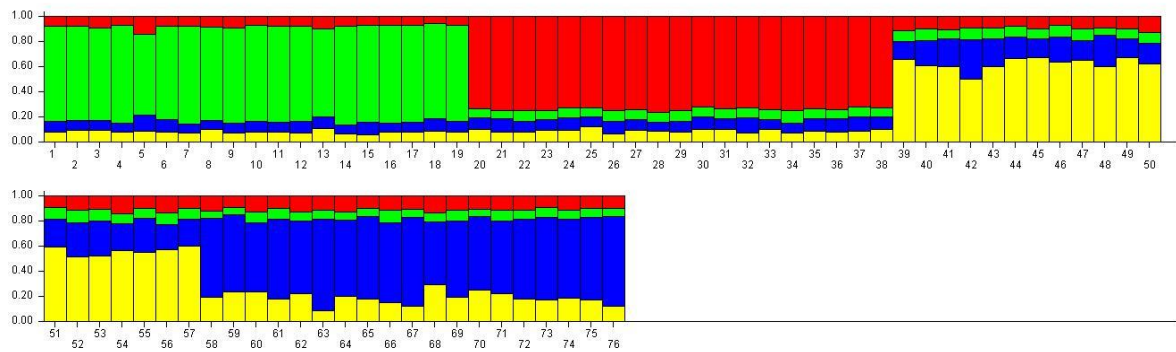
**Figura 2.** Géis mostrando os perfis eletroforéticos dos marcadores ISSR. Primer 810 em 76 plantas de *Stylosanthes scabra* de quatro populações nativas no estado de Pernambuco, Brasil. M: marcador de peso molecular de 100pb.



**Figura 3.** Número de bandas privadas por primers em populações de *S. scabra* de Pernambuco.



**Figura 4.** Análises molecular da variância (AMOVA). Revelando 40% da variância genética dentro da população e 60% entre a população.



**Figura 5.** Representação dos 76 indivíduos de quatro populações naturais de *S. scabra* segundo dados moleculares com ISSRs utilizando o programa “Structure”. Os indivíduos estão representados por barras verticais com coloração de acordo com o grupo ao qual pertencem (quatro grupos,  $K = 4$ ). Grupo 01 – Santa Cruz do Capibaribe; Grupo 02 - Floresta; Grupo 03- Sertânia e Grupo 04- Petrolina.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Caracteres morfológicos e marcadores ISSR foram eficientes para o estudo de diversidade genética em *Desmanthus* sp, revelando grande diversidade entre as adesões. Assim, para explorar a máxima divergência genética, os acessos 17L, 27L, 25F, 22F, 19S e 28G podem ser utilizados em futuros programas de melhoramento, pois diferem de outros acessos por marcadores morfológicos e moleculares.

Foi possível coletar seis diferentes espécies do gênero *Stylosanthes* em Pernambuco. A alta variabilidade fenotípica entre os acessos mostrou a importância das coletas realizadas.

Os marcadores ISSR foram eficientes para a quantificação da diversidade genética de *S. scabra* em populações naturais em Pernambuco. A espécie apresenta maior variabilidade entre populações do que dentro das populações.

## 6. APÊNDICES

---



## 7.1. Características das espécies

### 7.1.1. *Stylosanthes angustifolia* Vogel.

Erva, ramos eretos (figura 1A), raramente prostrados, 20–60 cm de altura; folhas pinado-trifolioladas, folíolos lineares, estreitos, até 0,2 cm de largura, glabros em ambas as faces; duas estípulas externas, 0,5–1,5 cm de comprimento e 0,4 cm de largura, lanceoladas, presença de estípulas internas; inflorescências espiciformes, longas, lineares e estreitas; flores com pétalas amarelas (figura 1B); cálice gamossépalo; fruto lomento, uniarticulado, rostro de ápice curvado, mais longo que o artícolo, acima de 0,4 cm comprimento (Medeiros,2014). A presença do artícolo está relacionada com o desenvolvimento completo dos órgãos reprodutivos das plantas. Inflorescências mais jovens tendem a apresentar maior número de frutos uniarticulados.



Figura 1. Planta de *S. angustifolia* (A), inflorescência e flor (B).

### 7.1.2. *Stylosanthes hamata* (L.) Taub.

Subarbusto, 14–40 cm de altura, prostrado (figura 2A); ramo tomentoso; estípula externa oblonga, verde, hialina entre as nervuras, estípula interna oblonga, verde-clara, hialina, glabra. Folha 11–26 mm de comprimento; pecíolo pubescente, 1–4 mm de comprimento; folíolo elíptico (figura 2B), ápice apiculado, base obtusa, glabro, inconspícuas, nervuras coletoras ausentes. Inflorescência oblonga, fasciculada, congesta, terminal.; Flor 8–11 mm de comprimento; corola amarela; estandarte orbicular, ápice obcordado, base

cuneada, mácula amarelo-dourada.; pétalas da quilha falciformes, 3–3,5 × 1–1,5 mm. Lomento 1–2 artículos, geralmente um artículo vestigial, oblongo ou elíptico, glabro, setoso, 2,7–3,8 × 1,3–2,2; estilete residual encurvado, 3–7 mm de comprimento; semente oblonga, amarela, amarela pintalgada de vermelho-vináceo ou marrom, 1,5–2 × 1–1,5 mm (Costa et al. 2008).

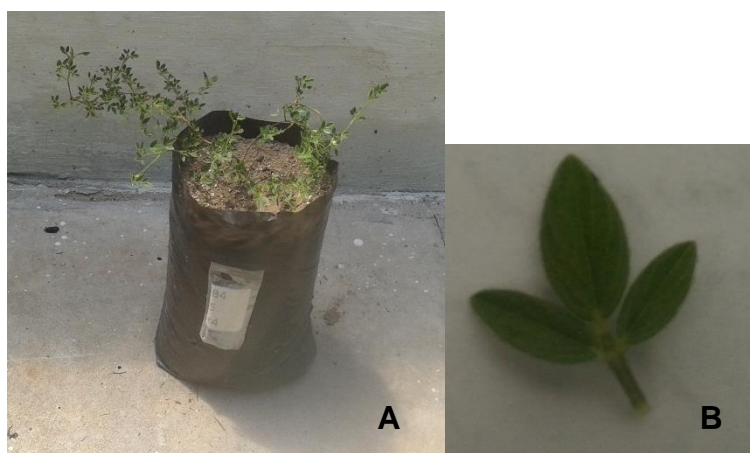


Figura 2. Planta de *S. angustifolia* (A) e folha (B).

### 7.1.3. *Stylosanthes humilis* H.B.K

Subarbusto, 20–30 cm de altura, prostrado (figura 3A); ramo geralmente setosos; estípula externa oblonga ou elíptica, verde, geralmente tomentosa, ápice acuminado, 2–3 mm de comprimento; estípula interna elíptica, ápice aristado; folha 11–22 mm de comprimento; pecíolo geralmente tomentoso, algumas vezes esparso-setoso, 2– 6,5 mm de comprimento; folíolo estreito-oblongo (figura 3B), ápice mucronado, base obtusa, geralmente tomentoso, algumas vezes esparso-setoso, nervuras coletoras ausentes. Inflorescência oblonga, fasciculada, congesta, terminal, axilar; bráctea interna ausente; bráctea externa oblonga, elíptica e largo-elíptica, tomentosa, venação paralelinérvea; flor 9,5–12,5 mm de comprimento; corola amarela; estandarte orbicular, ápice obcordado, base cuneada, mácula vermelho-vinácea; pétalas da quilha falciformes; lomento com 1 artículo; segundo artículo vestigial, ovóide, largo-elíptico, pubescente ou esparso-tomentoso; semente elíptica, amarela ou marrom-escuro, 2,5 × 1–1,5 mm (Costa et al. 2008)..



Figura 3. Planta de *S. humilis* (A) e folha (B).

#### 7.1.4. *Stylosanthes macrocephala* M. B. Ferr. and S. Costa.

Subarbusto, 50–60 cm de altura, prostrado (figura 4A); ramo setoso; estípula externa oblonga, ovóide, verde, tomentosa; ápice acuminado; estípula interna largo-oblonga, hialina, esparsopubescente, ápice aristado. Folhas 16–24 mm; pecíolo tomentoso, 2–6 mm de comprimento, raque foliar tomentoso; folíolo oblanceolado, ápice mucronado, base obtusa, esparso-vilosa, conspícuas, nervuras coletoras ausentes. Inflorescência largo-ovóide, isolada, congesta, terminal e axilar (figura 4B); bráctea externa largoelíptica, tomentosa, setosa, venação campilódroma, trifoliolada, ápice acuminado; 3–5,7mm de comprimento; bráctea interna elíptica, largo-elíptica ou ovóide, pubescente, ápice aristado, base amplexicaule; eixo plumoso setoso, 3,5–8 mm de comprimento; bractéola externa 1, interna 2, lanceoladas, denso-tomentosas, ápice aristado; flor 10–13 mm de comprimento; corola amarela; estandarte obcordado, ápice obcordado, base cuneada, mácula amarelo-dourado; asa obovada, 3–4 × 2–2,6; lomento com dois artículos, oblongo, largo-ovóide, glabro ou esparsotomentoso; semente oblonga, marrom (Costa et al. 2008)..

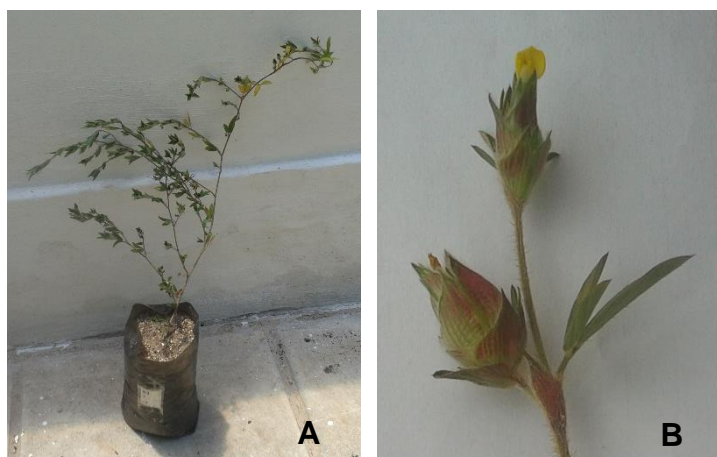


Figura 4. Planta de *S. macrocephala* (A) e inflorescência (B).

#### 7.1.5. *Stylosanthes mucronata* Willd

Subarbusto, 50–90 cm de altura, ereto (figura 5A) ; ramo densamente setosos, estípula externa oblonga ou elíptica, verde, geralmente tomentosa, ápice mucronado, 2–3 mm de comprimento; estípula interna elíptica, ápice aristado; folha 9–18 mm de comprimento; folíolo estreito em ambas as extremidades, ápice mucronado, nervuras coletoras presentes; Ramos densamente pubescêntes; corola amarela; estandarte orbicular, ápice obcordado, base cuneada, mácula vermelho-vinácea (figura 5B) ; lomento com 2 artículos; semente com comprimento de 3,5 a 4 mm (Walters, 1951).

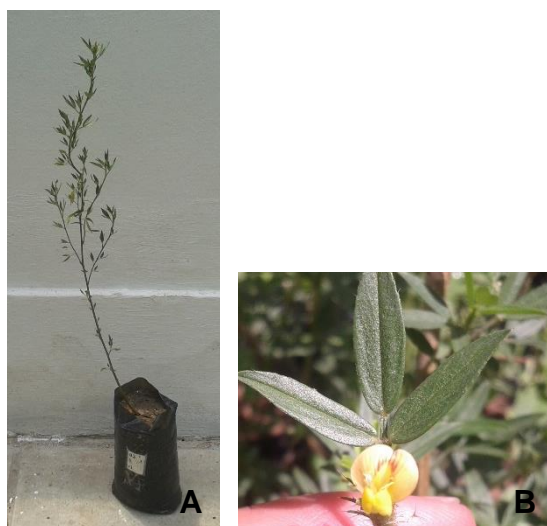


Figura 5. Planta de *S. mucronata* (A), flor e folha (B).

#### 7.1.6. *Stylosanthes scabra* J. Vogel.

A altura , 40–200 cm de altura, subarbusciva, leguminosa perene, ereta (figura 6A), densamente pilosa e viscosa. Foliolos de 8–29 mm de comprimento, pilosas sobre ambas as superfícies, oblongo-lanceoladas e de cor verde escuro; bráctea interna elíptica, glabra, 4–7 × 2–3,5 mm, ápice aristado; eixo plumoso, esparso-tomentoso, 2,5–7 mm de comprimento; bractéola externa 1, interna 2, lanceoladas, lineares, glabra, ápice aristado. Flor 8–9,5 mm de comprimento; corola amarela; estandarte obcordado, ápice obcordado, base cuneada, mácula vermelho-vináceas (figura 6B); pétalas da quilha falciformes, 2,5–3 × 1–2 mm. Lomento com 2 artículos férteis, obovado ou elíptico, esparso a denso-setoso, 3–7 × 1–3 mm; estilete residual encurvado, 1–2,5 mm de comprimento; semente largo-elíptica ou largo-oblonga, amarelo-ocre ou preta, 1–2,5 × 1–2 mm (Costa et al. 2008).

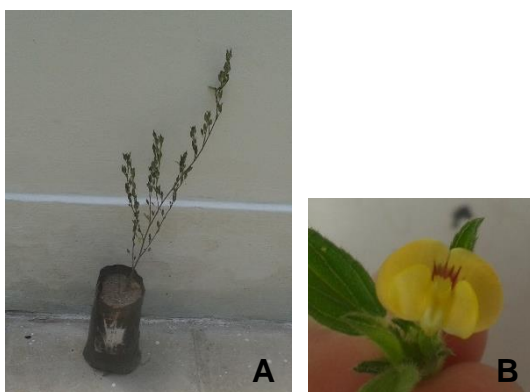


Figura 6. Planta de *S. scabra* (A) e flor (B).

## 7.2 Referências

Costa LC, Sartori ALB and Pott A (2008) Estudo taxonômico de *Stylosanthes* em Mato Grosso do Sul. **Rodriguésia** 59:547-572

Medeiros E and Flores AS (2014) O gênero *Stylosanthes* (Leguminosae) em Roraima. **Rodriguésia** 65:235-244.

Walters, SM (1951) Flowering plants of the Sudan. Sudan government **Journal of ecology** 39(2):422-422.

## 7. ANEXOS

---

## 7.1. NORMAS DA REVISTA CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY

### Instruções aos Autores

#### *Política geral e escopo da revista*

A **CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY** (ISSN 1984-7033, versão on line) - é a revista trimestral oficial da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas (<http://www.sbmp.org.br>). O nome internacional abreviado é CROP BREED APPL BIOTECHNOL. A revista está indexada na ISI Thomson Reuters, Scopus, AGRIS, CAB International Abstracts, Biosys, Latindex, Periódica, Chemical Abstracts Service, Agricola, Agrobase, Wilson, Ebsco, DOAJ, Acervo Documental da Embrapa and Portal da Capes e destina-se à publicação de artigos científicos originais que possam contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico do melhoramento e da agricultura. Os artigos deverão contemplar as pesquisas básica e aplicada em melhoramento de plantas perenes e anuais, nas áreas de genética, conservação de germoplasma, biotecnologia, genômica, citogenética, estatística experimental, sementes, qualidade de alimentos, estresse biótico e abiótico, e áreas correlatas. O artigo deve ser inédito, sendo vetada a submissão do mesmo a outro periódico. As opiniões e conceitos emitidos são de exclusiva responsabilidade dos autores, não refletindo necessariamente as idéias da Editoria. A Editoria, porém se reserva o direito de sugerir ou solicitar as modificações que se fizerem necessárias. A Revista adota o sistema Ithenticate para identificação de plágio. A reprodução completa ou parcial dos artigos é permitida, desde que citada a fonte. Todo o conteúdo da revista, exceto onde identificado, é licenciado para Creative Commons. Todos os artigos são publicados gratuitamente. CBAB é uma revista de acesso livre.

#### *Artigo*

A **CBAB** publica artigo exclusivamente em inglês. Autores devem submeter seus artigos redigidos em inglês. Se o artigo for aprovado, ele deve ser



obrigatoriamente revisado, em termos linguísticos, e a revisão será feita exclusivamente pelos tradutores oficiais da CBAB, com ônus para o autor. Contribuições são submetidas via WEB acessando <http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/index.php>, clicando **Submission**. O sistema de gerenciamento de artigos solicitará o e-mail do autor correspondente e a geração de uma senha. **Os manuscritos deverão ser inseridos sem os nomes dos autores e seus endereços, os quais deverão ser disponibilizados em um formulário à parte.** Como a CBAB opera com revisão do tipo duplo cego, autores não devem revelar suas identidades no manuscrito. Com seu e-mail e sua senha pessoal, o autor poderá acompanhar toda a tramitação do seu artigo. A avaliação do artigo será feita por revisores *ad hoc* especialistas, para auxiliar a Editoria quanto à decisão final de aceite, modificações ou rejeição do mesmo.

O artigo completo deverá conter, preferencialmente, a seguinte sequência: title, abstract, key words, introduction, material and methods, results and discussion, acknowledgements, references, and tables and figures. A digitação deverá ser feita em Word for Windows, em fonte times new roman, tamanho 12, espaçamento duplo, formato A4, com margens de 20 mm e paginação consecutiva no topo à direita. O artigo não deverá exceder a 18 páginas, incluindo tabelas e figuras digitadas em páginas separadas (uma por página) ao final do texto. Todas as equações, modelos e símbolos devem ser inseridos via Microsoft Equation. O Título deverá ser claro, conciso e refletir a essência do artigo. Escrito com a inicial maiúscula e posto a esquerda, não deve conter mais de 15 palavras digitadas em bold. O Abstract não deve exceder a 150 palavras. Um máximo de cinco palavras-chave, diferentes do título, será permitido. A introdução deve incluir uma breve revisão de literatura sobre o tema e os objetivos da pesquisa. O Material e Método deve ser redigido de modo que outro pesquisador possa repetir a experiência. Preferencialmente, Resultados e Discussão devem ser apresentados em conjunto, para maior dinâmica de leitura. Os agradecimentos devem ser sucintos, limitados a colaboradores efetivos e agências financiadoras.

**Cuidado com as Referências.** Não citar resumos de eventos, teses e nem artigos não publicados. Esses cuidados darão maior credibilidade ao artigo e a revista. As citações feitas no texto pelo sobrenome do autor e ano (por exemplo, Liu 1998, Pereira and Amaral Júnior 2001, William et al. 1990) deverão ser ordenadas alfabeticamente no item Referências, seguindo os exemplos abaixo:

*Artigos em periódicos:*

Pereira MG and Amaral Júnior AT (2001) Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. **Crop Breeding and Applied Biotechnology 1**: 3-10.

*Livro:*

Ramalho MAP, Ferreira DF and Oliveira AC (2000) **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Editora UFLA, Lavras, 326p.

*Capítulo de livro:*

Sakiyama NS, Pereira AA and Zambolim L (1999) Melhoramento do café arábica. In Borém A (ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Editora UFV, Viçosa, p. 189-204.

*Congresso:*

Frey KJ (1992) Plant breeding perspectives for the 1990s. In Stalker HT and Murphy JP (eds.) **Proceedings of the Symposium on Plant Breeding in the 1990s**. CAB, Wallingford, p. 1-13.

## 7.2. NORMAS DA REVISTA

### **GMR- GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH**

#### **Submission informations**

Are you ready to submit your manuscript? Please review the submission guidelines and then refer to this checklist to ensure that you have gathered all the relevant information and that the manuscript is properly formatted.

All manuscripts must be submitted using the online submission system.

If you are sure your work satisfies the basic requirements for publication in GMR, we will be happy to consider your paper.

Successful receipt and processing of the author's submission will be acknowledged by e-mail once the submitted manuscript has been checked.

If no reply has been received within one week, the author should contact the editor at [gmr@geneticsmr.com].

Articles are reviewed anonymously by independent peer reviewers. Authors are encouraged to suggest names of expert reviewers, but selection remains the prerogative of the editors. To facilitate the review process, the authors can send supplementary material, such as accepted but not yet published papers that have been cited, which may be important during assessment of the manuscript.

#### **ARTICLE PROCESSING CHARGE**

To provide open access, GMR's business model offsets expenses—including peer review management, journal production, and online hosting and archiving—by applying an article processing charge for each article published, to be paid by the authors, institutions, or funders.

The article processing fee applied by GMR consists of a submission fee plus a publication fee.

Read more about submission fee and publication fee.

#### **AUTHOR LIST**

All authors are aware and approving of submission of the manuscript, the manuscript's content, the authorship, and the order of authorship.

You have the following information for all authors:

- First name, middle name(s)/initial(s), last name
- Work affiliation(s)
- E-mail address
- Any conflicts of interest
- Financial disclosure/funding information
- Signature on the cover letter

### **ACKNOWLEDGMENTS**

You have confirmed that everyone named in the Acknowledgments section agrees to be so named.

### **ARTICLE FILE**

The article file is in .doc or .docx format, prepared per the **Submission Guidelines**.

### **PREPARATION OF THE MANUSCRIPT**

The sections comprising the manuscript are ordered as follows:

- Title
- Running title
- Authors
- Addresses
- Abstract
- Key words
- Introduction
- Material and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgments
- References

### **TITLE PAGE**

The title page includes the title of the article, authors' names (names and initials (only) thinking in indexing services), and author affiliations.

Affiliations include the author's department, institution (usually a university or company), city, and state or nation. The title page includes the name, complete mailing address, and e-mail address of the author designated to review proofs. A running title of no more than 60 characters (including spaces) is provided.

#### **TITLE**

A full title (no more than 150 characters) and a running title (no more than 60 characters) are provided.

#### **ABSTRACT**

An Abstract of no more than 300 words is included.

#### **DATA**

All appropriate datasets, images, and information are deposited in the relevant repositories, and undeposited data are submitted as supplementary material files.

#### **NOMENCLATURE**

Standard nomenclature is used throughout the manuscript file.

#### **ABBREVIATIONS**

Non-standard abbreviations are defined upon their first use in the text.

#### **FIGURES AND TABLES**

All figures and tables are called out in the manuscript in ascending numeric order, upon first appearance. Original figure files are uploaded using high resolution (300-600 dpi) .tiff format. If any of your figures is under copyright, you have notified the journal office.

#### **EQUATIONS**

You have used MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome; or Equation Editor if using MathType is not possible.

#### **REFERENCES**

Examples of bibliographic style

JOURNAL (Standard article). Ex.: Chao EC and Lipkin SM (2006). Molecular models for the tissue specificity of DNA mismatch repair-deficient carcinogenesis. *Nucleic Acids Res.* 34: 840-852.

Ranke MB, Lindberg A, Ferrandez Longas A, Darendeliler F, et al. (2007). Major determinants of height development in Turner syndrome (TS) patients treated with GH: analysis of 987 patients from KIGS. *Pediatr. Res.* 61: 105-110.

BOOK, WHOLE: authors, year, book title, edition or volume number, publisher, city. Ex.: Bartholomei-Santos ML and Sokal RR (1973). *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Company, San Francisco. Cicotti and Tildesley DJ (1987). *Computer simulation of liquids*. 1st edn. Oxford University Press, New York.

BOOK CHAPTER: authors, year, book title, chapter title, editors, edition, publisher, city, pages of citation. Ex.: Drosopoulou E (1981). The Drosophilidae: A Taxonomic Overview. In: *The Genetics and Biology of Drosophila* (Ashburner M, Carson HL and Thompson JN Jr, eds.). Academic Press, New York, 1-97.

REPORT. Ex.: CIAT (International Center for Tropical Agriculture) (1980). *Annual Report*. CIAT, Cali. FAO (Food and Agricultural Organization) (2004). *Production Yearbook*. FAO, Rome.

THESIS. Ex.: Hellmann K and Gömori G (1997). *Estudo citoquímico em glândulas salivares de triatomíneos do gênero Rhodnius*. Master's thesis, UNESP, São José do Rio Preto.

Pepin L (2003). *Aplicação de marcadores microssatélites de *Sus scrofa* doméstica na caracterização genética de populações de *Sus scrofa* sp (porco-monteiro) e *Tayassu pecari* (queixada)*. Doctoral thesis, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto.

CONFERENCE, SYMPOSIUM PROCEEDINGS: cite papers only from published proceedings. Ex.: Lehninger AL, Silva MB, Lombardi F, Zamaro PJA, et al. (2002). Análise do comportamento eletroforético das frações de hemoglobinas de *Rhinoclemys punctularia* (Chelonia) em diferentes pH. In: *Anais do 48º Congresso Nacional de Genética*, Ribeirão Preto.

Olsen GJ, Ludwig T, Meier H and Wolf MJ (2002). *AxML: a fast program for sequential and parallel phylogenetic tree calculations based on the maximum*

likelihood method. Proceedings of 1st IEEE Computer Society Bioinformatics Conference (CSB2002), Palo Alto, 21-28.

Pacheco EB and Miyazawa CS (2002). Estudos citogenéticos em Cheirodontinae (Characiformes, Characidae) do pantanal do Mato Grosso. In: IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá, 38. Schaeffer LR, Swalve HH and Dekkers JCM (1994). Random regressions in animal models for test-day production in dairy cattle. Proceedings of the 5th World Congress of Genetic and Applied Livestock Production, Guelph, 433-446.

ELECTRONIC CITATIONS (Online Journals): ensure that URLs are active and available. Ex.: Rozen S and Skaletsky HJ (2000). Primer3: Bioinformatics Methods and Protocols. In: Methods in Molecular Biology (Krawetz S and Misener S, eds.). Humana Press, New Jersey, 365-386. Available at [[http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)]. Accessed August 21, 2006.