



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E
MORFOAGRONÔMICA DE GERMOPLASMA
DE *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) SW.**

CLÁUDIO TAKAO KARIA

Orientador:
Prof. João Batista Duarte

CLÁUDIO TAKAO KARIA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MORFOAGRONÔMICA DE
GERMOPLASMA DE *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) SW.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

Prof. Dr. João Batista Duarte

Co-orientador:

Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho

Goiânia, GO – Brasil

2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

K18c Karia, Cláudio Takao..
Caracterização genética e morfoagronômica de germoplasma de *Stylosanthes guianenses* (Aubl.) SW.[manuscrito] / Cláudio Takao Karia. – 2008.
138f.: il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Duarte ; Co-Orientador:
Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2008.

Bibliografia: f.108-125.

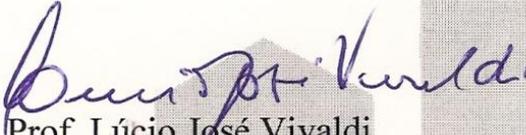
1. Genética vegetal – Recurso de germoplasma 2. Plantas – Melhoramento genético 3. Melhoramento genético vegetal 4. Germoplasma vegetal – Recursos – Utilização 5. Leguminosa 6. Plantas forrageiras 7. Pastagens 8. Estilosante 9. Plantas – Genética molecular I. Duarte, João Batista II. Coelho, Alexandre Siqueira Guedes
III. Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. IV. Título

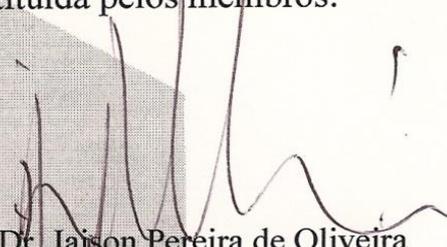
CDU: 633.37:631.524

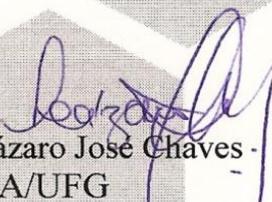
CLÁUDIO TAKAO KARIA

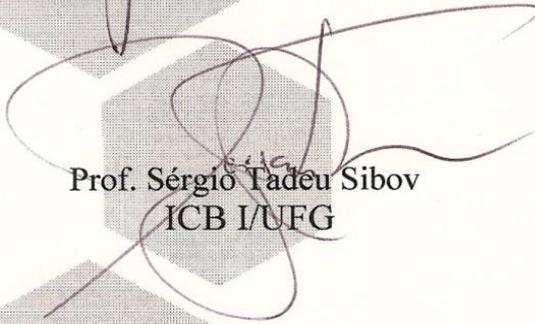
TÍTULO: “Caracterização genética e morfoagronômica de germoplasma de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) SW”.

Tese DEFENDIDA e APROVADA em 22 de agosto de 2008, pela Banca Examinadora Constituída pelos membros:


Prof. Lúcio José Vivaldi
UnB – Universidade de Brasília


Dr. Jaison Pereira de Oliveira
Embrapa Arroz e Feijão


Prof. Lázaro José Chaves -
EA/UFG


Prof. Sérgio Yadeu Sibov
ICB I/UFG


Prof. João Batista Duarte
Orientador – EA/UFG

UFG
Goiânia - Goiás
Brasil

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Issamo e Fumiko**,
pela incansável luta na formação dos filhos.

À minha esposa, **Soraia**, pelo companheirismo,
compreensão, paciência e dedicação durante
todos os anos de convivência.

Aos meus filhos, **Bruno e Juliana**, pela
felicidade e orgulho que me trazem.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pela oportunidade e pelo total apoio para o desenvolvimento do trabalho e para o aperfeiçoamento profissional.

À Universidade Federal de Goiás, através da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos e do Instituto de Ciências Biológicas.

Ao professor Dr. João Batista Duarte pela orientação, incentivo e dedicação dispensados para a realização do trabalho; um exemplo profissional e pessoal.

Ao professor Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, pelos conhecimentos transmitidos e pela co-orientação na realização do trabalho.

Aos Drs. Lúcio José Vivaldi, Jaison Pereira de Oliveira, Lázaro José Chaves, Sérgio Tadeu Sibov e Roland Vencovsky pela revisão e sugestões para a melhoria do trabalho.

Ao amigo, conselheiro acadêmico e pesquisador da Embrapa, Ronaldo Pereira de Andrade, pelo incentivo e apoio para a realização do curso de pós-graduação, pela confiança na minha carreira profissional e, sobretudo, pela grande amizade.

Aos professores e funcionários da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás. Agradecimento especial ao secretário da pós-graduação, Welinton Barbosa, pela presteza, alegria e amizade.

Aos colegas da Embrapa Fábio Gelape Faleiro e Allan Kardec Braga Ramos pela colaboração, respectivamente, nas análises laboratoriais e no trabalho de campo, desenvolvidos na Embrapa Cerrados.

À colega Marlei de Fátima Pereira pela colaboração nas análises laboratoriais desenvolvidas na UFG.

Aos funcionários da Embrapa Cerrados Ivanilson Luís Lopes da Silva, Alfredo Jorge Nogueira (*in memoriam*), Frans H. Backx, Evaldo Linhares de Holanda, Edson Inácio dos Santos, João Michnik, Edson Xavier, João Batista dos Santos e às bolsistas Graciele Bellon e Kênia Gracielle da Fonseca, pelo auxílio na condução dos trabalhos de campo e de laboratório desenvolvidos na Embrapa Cerrados.

Ao grande amigo, companheiro e compadre, Angel Blanco, pelas intermináveis discussões técnicas, políticas, sociais, econômicas e ambientais; pela ajuda no laboratório de biologia molecular e, também, à sua esposa Simone, pelas diversas acolhidas em sua residência.

Ao meu irmão Luiz Issao, minha cunhada Jane e minha comadre Sílvia pelo incentivo e auxílio na locação de imóvel em Goiânia. Também, à Mary e aos amigos Cleonice e Minoru pela grande ajuda, sobretudo no primeiro semestre em Goiânia.

Ao amigo Marcelo Ayres Carvalho, pesquisador da Embrapa Cerrados, pelo incentivo e também pela ajuda na elaboração dos textos em inglês.

A todos os colegas da pós-graduação, especialmente ao Robélio, Keyla, Robertha, Waldir, Ludmilla, Aracelle, Luíce, Medina, Rita, e Weber pelos agradáveis momentos de convivência.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	7
GENERAL ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO GERAL	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 O GÊNERO <i>Stylosanthes</i> SW.....	16
2.1.1 Distribuição natural, taxonomia e caracterização	16
2.1.2 Utilização e principais cultivares	23
2.2 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE BANCOS DE GERMOPLASMA	32
2.2.1 Aspectos gerais da caracterização de germoplasma	32
2.2.2 Caracterização morfoagronômica	36
2.2.3 Caracterização genético-molecular	38
2.2.4 Estatística multivariada para dados de bancos de germoplasma	45
2.2.4.1 Análise de componentes principais	45
2.2.4.2 Análise de coordenadas principais	49
2.2.4.3 Medidas de similaridade e dissimilaridade	50
2.2.4.4 Análises de agrupamento	53
3 CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE ACESSOS DE STYLOSANTHES GUIANENSIS	61
RESUMO	61
ABSTRACT.....	62
3.1 INTRODUÇÃO	63
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	65
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.4 CONCLUSÕES	83
4 VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE STYLOSANTHES GUIANENSIS UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES	84
RESUMO	84
ABSTRACT.....	85
4.1 INTRODUÇÃO	86
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	88
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4.4 CONCLUSÕES	106
5 CONCLUSÕES GERAIS	107
6 REFERÊNCIAS	108
ANEXO	126

RESUMO GERAL

KARIA, C. T. **Caracterização genética e morfoagronômica de germoplasma de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.** 2008. 138 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.¹

Os recursos genéticos vegetais armazenados *ex situ*, em geral, são pouco utilizados nos sistemas de produção e no melhoramento genético de plantas. Um dos principais motivos deste uso incipiente é a dificuldade de se obterem as informações sobre os acessos armazenados, sobretudo os dados de caracterização e avaliação preliminar. A espécie *Stylosanthes guianensis*, diplóide e preferencialmente autógama, possui grande quantidade desses acessos e potencial de utilização em sistemas agrícolas. Somente no Banco de Germoplasma da Embrapa existe uma coleção com cerca de mil acessos registrados de *S. guianensis*. Por outro lado, apenas um genótipo dessa espécie é hoje comercializado no Brasil, a cultivar Mineirão. Para promover a utilização desses recursos, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar os acessos de *S. guianensis*, armazenados no Banco de Germoplasma da Embrapa, utilizando-se caracteres morfoagronômicos e marcadores de locos microssatélites (SSR). Na caracterização morfoagronômica, foram avaliados 535 acessos acerca de 23 caracteres quantitativos. Os dados correspondentes foram estatisticamente investigados empregando-se a análise de componentes principais, a análise de agrupamento, pelo método aglomerativo de Ward, e a análise de variância (univariada), associada ao teste de Tukey, para comparar as médias dos grupos identificados. Foram estabelecidos treze grupos de acessos similares, dos quais, cinco foram considerados de maior potencial para a utilização nos sistemas agrícolas. Considerando-se apenas os grupos potenciais, é possível reduzir o número de acessos a serem avaliados mais detalhadamente, de 535 para 126 acessos. Na caracterização genético-molecular foram considerados 437 acessos da coleção, utilizando-se sete *primers* microssatélites, marcados com fluorescência, e a detecção dos fragmentos de DNA obtidos via PCR (reação da polimerase em cadeia) foi feita por meio da técnica de eletroforese em capilar. Os sete locos produziram 45 alelos (6,43 alelos/loco), dos quais quatro foram alelos privados. Tanto na análise de coordenadas principais, como na análise de agrupamento, neste caso pelo método UPGMA, os acessos demonstraram tendência de se reunirem em grupos, conforme as variedades botânicas da espécie (*canescens*, *guianensis* e *pauciflora*), exceto para a variedade *microcephala*. A correlação entre as dissimilaridades genéticas e morfoagronômicas foi altamente significativa, porém, de baixa magnitude ($r = 0,23$; $P \leq 0,0001$), indicando que ambas as avaliações são importantes e devem ser realizadas para a melhor caracterização desses acessos e, possivelmente, da espécie. Considerando-se os grupos com potencial agrônomico, selecionados na avaliação morfoagronômica, identificaram-se acessos geneticamente bastante dissimilares da cultivar Mineirão, que devem ser mais bem avaliados agronomicamente, para compor possíveis cruzamentos com essa cultivar, em programas de melhoramento da espécie. Assim, os resultados deste trabalho permitirão aumentar a eficiência e a eficácia das atividades no Banco de Germoplasma em estudo, subsidiar a escolha de genótipos a serem testados em avaliações agrônomicas, podendo, ainda, estimular outras pesquisas com esses recursos genéticos.

Palavras-chave: recursos genéticos, leguminosa, forrageira tropical, estilosantes, marcador SSR, microssatélite.

¹ Orientador: Prof. Dr. João Batista Duarte. EA-UFG.

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho. ICB-UFG.

GENERAL ABSTRACT

KARIA, C. T. **Genetic and morpho-agronomic characterization of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. germplasm.** 2008. 138 f. Thesis (Doctorate in Agronomy: Genetic and Plant Breeding)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.¹

Plant genetic resources maintained *ex situ*, in germplasm banks, are few used in agricultural systems and genetic plant breeding programs. One of the main reasons of this incipient use is the difficulty to obtain information about stored accessions, especially the characterization and preliminary evaluation data. *Stylosanthes guianensis* is a predominantly self-pollinated and diploid species, which has a great number of this stored accessions and potential for use in agricultural systems. There are approximately one thousand accessions of the *S. guianensis* in Embrapa's germplasm bank. Moreover, only one genotype of this species is now available to commercial growers in Brazil, the cultivar Mineirão. To promote the use of these resources, this study aimed to characterize accessions of *S. guianensis*, stored in the germplasm bank of Embrapa, using morpho-agronomic traits and microsatellites markers (SSR). In morpho-agronomic characterization 535 accessions were evaluated using 23 quantitative traits. The data were analyzed by a principal component analysis (PCA), the Ward's agglomerative hierarchical clustering method, and by univariate analysis of variance, associated to a Tukey test for comparisons among means of the established groups. Thirteen similarity accession groups were established, five of them were considered the ones with the highest potential use in agricultural systems. Regarding these potential groups, it is possible to reduce from 535 to 126 accessions to be thoroughly evaluated. The molecular characterization was made in 437 accessions, using seven microsatellites fluorescent primers, and the detection of the DNA fragments generated by PCR (Polimerase Chain Reaction) was accomplished by a capillary electrophoresis. The seven loci provided 45 alleles (6.43 alleles/locus), of which four were private alleles. Both, principal coordinates analysis and cluster analysis, in this case, by UPGMA agglomerative method, showed a tendency to group accessions together by botanical varieties (*canescens*, *guianensis* and *pauciflora*), except for the *microcephala* variety. The correlation between the genetic and morpho-agronomic dissimilarities was highly significant, however, it was of low magnitude ($r = 0.23$, $P \leq 0.0001$). This indicates that both evaluations are important and should be performed to achieve a more complete characterization of these accessions and, possibly, of the species. Taking account the germplasm accessions with agronomic potential, selected based on the morpho-agronomic evaluation, several of them presented significant genetic dissimilarities to the Mineirão cultivar. These accessions should be better assessed for agronomic traits, and crossed with this cultivar in breeding programs of the species. The results of this research will allow increasing the efficiency and effectiveness of the germplasm bank activities, helping the choice of genotypes to be tested in agronomic evaluations, and stimulating further researches with these genetic resources.

Key words: genetic resources, legume, tropical forage, stylo, SSR marker, microsatellite.

¹ Adviser: Prof. Dr. João Batista Duarte. EA-UFG.

Co-adviser: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho. ICB-UFG.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os recursos da biodiversidade vegetal são considerados um importante insumo da agricultura moderna, contribuindo para o aumento da produtividade das culturas, uma vez que são um grande repositório de genes. Esses recursos podem ser diretamente utilizados nos sistemas produtivos, ou então servir como fonte de genes para serem introduzidos em novas cultivares por meio do melhoramento genético. Assim, é fundamental a sua conservação, a fim de se evitar a perda de alelos potencialmente importantes para a manutenção da agricultura e para o aumento da eficiência dos sistemas produtivos.

Em geral, para os melhoristas de plantas, os acessos armazenados *ex situ* nos bancos de germoplasma são a fonte primária de alelos de uma determinada espécie, e devem estar disponíveis não somente o germoplasma, mas também informações importantes para auxiliar na escolha de acessos a serem avaliados e utilizados no processo de seleção e melhoramento genético. Entende-se por germoplasma, a estrutura física vegetal, animal ou de microorganismos, dotada de caracteres hereditários, capaz de gerar um novo indivíduo, transmitindo suas características de geração em geração (IBPGR, 1991; Ribeiro, 1995).

A conservação *ex situ* dos recursos genéticos nos bancos de germoplasma é uma atividade que vai além do simples armazenamento de sementes em câmaras frias. Envolve também o enriquecimento da coleção por meio de intercâmbio e coleta, a correta identificação taxonômica, a multiplicação do germoplasma, a caracterização morfológica e molecular, a avaliação agrônômica preliminar, os estudos básicos sobre as condições ideais para a conservação, o monitoramento e regeneração periódica dos acessos armazenados e, por fim, a disponibilização do germoplasma e de todas as informações sobre os acessos. É uma atividade dinâmica, de alto custo, que envolve muitas áreas de conhecimento e recursos humanos (Paterniani & Goodman, 1977). Dessa forma, esta atividade só se justifica se os recursos genéticos forem utilizados (Nass, 2001), ou ainda, se houver uma expectativa futura de uso (Sackville Hamilton et al., 2002).

Frankel & Brown (1984) distinguem três fases das atividades em recursos genéticos. A primeira enfatizava a biogeografia, taxonomia e a evolução; a segunda, a conservação; e, na terceira fase, que se iniciou na década de 1980, seria dada ênfase à utilização da diversidade armazenada. Apesar de lógica, a terceira fase ainda não ocorreu na intensidade esperada (Peeters & Williams, 1984; Humphreys, 2003).

Para a maioria das espécies, o baixo nível de utilização dos recursos genéticos armazenados nos bancos de germoplasma tem como a principal causa a falta de informação sobre os acessos, devido à inexistência, insuficiência ou, ainda, inacessibilidade dos dados. Esse fato e a possibilidade de introgressão de alelos indesejáveis em populações melhoradas não estimulam os melhoristas a incorporarem novos genótipos aos seus programas, que, geralmente, já possuem uma coleção de trabalho amplamente conhecida e com alta frequência de alelos desejáveis (van Sloten, 1987; Humphreys, 2003). No caso brasileiro, há de se acrescentar que não existem programas de melhoramento genético para muitas espécies armazenadas nesses bancos. Ademais, segundo Frankel (1989), a eficiência dos bancos de genes em cumprir o seu papel, depende grandemente da força dos programas de melhoramento genético.

Recentemente, alguns autores têm apontado a criação de leis, como a de propriedade intelectual e a de acesso aos recursos genéticos e conhecimento tradicional associado, nos países signatários da Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB), como mais um fator restritivo à essa utilização. Essas leis, que de certa forma restringem a coleta e o intercâmbio de germoplasma, também determinam a repartição dos benefícios advindos da exploração desses recursos e, de fato, têm dificultado as pesquisas inerentes ao assunto no Brasil (Ferro et al., 2006). Isto acontece, sobretudo, na fase atual de implementação dos novos arranjos institucionais necessários para o cumprimento das exigências legais, de aprimoramento da legislação e, também, do entendimento do processo por parte dos pesquisadores (Azevedo, 2005).

De toda forma, a utilização, ou mesmo alguma indicação sobre a expectativa futura de uso dos recursos genéticos, somente será possível se o germoplasma estiver disponível e se houver informações adequadas sobre os acessos armazenados. Assim, uma vez introduzidos, os trabalhos de caracterização, avaliação, conservação, multiplicação de germoplasma e manutenção de banco de dados são essenciais, não somente para estimular a utilização desses acessos, mas também para orientar a tomada de decisões para se

otimizarem as dispendiosas atividades em bancos de germoplasma (Sackville Hamilton et al., 2002).

Para a maioria das espécies cultivadas, observa-se que o nível da variabilidade genética utilizado nas cultivares é bastante restrito. No Brasil, chama-se a atenção o caso das pastagens. Estima-se que a área total de pastagens no país seja de aproximadamente 259 milhões de hectares, dos quais, 144 milhões são de pastagens nativas e 115 milhões, cultivadas. Nesta última categoria, há a predominância de gramíneas do gênero *Brachiaria*, cuja área plantada na região do Cerrado é estimada em 45 milhões de hectares. Considerando-se que, na safra 2008, a área total para a produção de grãos (algodão, amendoim, arroz, aveia, centeio, cevada, feijão, girassol, mamona, milho, soja, sorgo, trigo e triticale), no Brasil, foi de 46,8 milhões de hectares (IBGE, 2008a), *Brachiaria* é, sem dúvida, o gênero de planta com a maior área cultivada no país.

Todas as cultivares atualmente cadastradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, dos dois gêneros de gramíneas forrageiras mais plantados, *Panicum* e *Brachiaria*, exceto *B. ruziziensis*, possuem modo de reprodução apomítico, ou seja, são cópias geneticamente idênticas às plantas mães (clones). Essa uniformidade genética, somada às extensas áreas plantadas com esses genótipos, aumenta a probabilidade de que pragas, doenças ou problemas fisiológicos causados por influência ambiental atinjam grandes áreas de pastagens, comprometendo a pecuária nacional e causando prejuízos econômicos, sociais e ambientais. A cultivar *B. brizantha* cv. Marandu é o genótipo com maior volume de sementes comercializadas no Brasil (Andrade, 2001), e já apresenta problemas advindos da chamada “monocultura do braquiarião”. Há, por exemplo, relatos de ataque de *Mahanarva spectabilis* a essa cultivar, que até então, esta era tida como resistente às cigarrinhas (Paula-Moraes et al., 2006).

A pecuária é uma das principais atividades econômicas do Brasil. Segundo estimativas recentes, o país possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com mais de 207 milhões de cabeças (CNPQ, 2008). Uma parcela superior a 90% desse rebanho é alimentada em sistemas baseados exclusivamente em pastagens que, em relação aos sistemas confinados, apresentam menores produtividades, mas conferem grande vantagem competitiva, pois permite a obtenção de produtos com baixo custo e de boa qualidade (Barcellos et al., 2001; Euclides et al. 2001). Essa vantagem, obtida pela abundância de terras e pelo constante incremento tecnológico (Euclides Filho, 2004), reflete-se na fartura

de carne e leite ofertada no mercado interno e na crescente conquista brasileira de mercados internacionais de carne; uma vez que, em 2007, o Brasil também foi o maior exportador mundial de carne bovina, em volume.

Outro fator preocupante para a cadeia produtiva é a perda da capacidade de produção das pastagens. Estimativas indicam que cerca de 80% das áreas com pastagem cultivada, no Brasil, estão degradadas ou em algum estágio de degradação (Barcellos, 1996). Atribui-se a perda da capacidade produtiva a diversos fatores, dentre os mais importantes, o estabelecimento de cultivares não adaptadas para o local, o manejo inadequado das pastagens, insuficiência ou inexistência de correção e manutenção da fertilidade do solo (Barcellos et al., 2001; Vilela, 2004; Macedo, 2005).

Em relação à fertilidade do solo, a principal causa da diminuição da produção de forragem, principalmente na região do Cerrado, é a deficiência de fósforo e de nitrogênio (Barcellos et al., 2001). Se a adubação com fertilizantes fosfatados em grandes áreas é um problema, pior é a solução para a aplicação de nitrogênio. Este nutriente é facilmente perdido no sistema solo-pastagem, principalmente pela volatilização de $N-NH_3$ e pela desnitrificação (Catchpoole et al., 1983). Assim, a aplicação do adubo nitrogenado, que é derivado do petróleo, deve ser feita periodicamente. O Brasil importa 65% do adubo nitrogenado que consome na agricultura e, em 2007, apenas na forma de uréia, sulfato de amônio e nitrato de amônio, importou cerca de 5,3 milhões de toneladas desses adubos, correspondendo a 1,84 milhão de toneladas de nitrogênio (Brasil, 2008a). A aplicação de apenas 50 kg de nitrogênio por hectare ao ano, que é a recomendação para sistemas de baixo nível tecnológico, nos 50 milhões de hectares de pastagens cultivadas na região do Cerrado, implicaria em aumento anual de 2,5 milhões de toneladas de nitrogênio nas importações, o que é praticamente impossível, considerando-se o atual cenário do mercado mundial de adubos e o preço do petróleo. Esses dados indicam, portanto, que a adubação com fertilizantes químicos não pode ser aplicada de forma generalizada.

A degradação ambiental é um fator preocupante em qualquer tipo de exploração agrícola, porém, na pecuária, é agravada pela grande extensão de área ocupada pela atividade. A pressão da sociedade mundial contra os processos de produção que degradam o meio ambiente é cada vez maior. Assim, no futuro, pode tornar-se uma barreira comercial aos produtos brasileiros. Segundo Macedo (2005), outro efeito da degradação de pastagens é o deslocamento dos produtores em busca de novas áreas para

abertura, sobretudo onde o preço da terra ainda é baixo, o que aumenta o desmatamento, sob o argumento dos elevados preços da recuperação ou renovação.

O desenvolvimento de alternativas para a manutenção ou restabelecimento da capacidade produtiva das pastagens cultivadas é fundamental para se alcançar a sustentabilidade e a intensificação da atividade pecuária no Brasil. A utilização de leguminosas para a incorporação de nitrogênio da atmosfera e a integração dos sistemas de produção de grãos com a pecuária apresentam-se, portanto, como opções potencialmente viáveis para atender a essa demanda, em extensas áreas.

A utilização de leguminosas em pastagens, além da incorporação de nitrogênio, também contribui para melhorar a qualidade da dieta animal, pois essas plantas possuem maior teor protéico do que as gramíneas. Leguminosas são amplamente empregadas em pastagens de regiões de clima temperado, entretanto, em áreas tropicais, essa prática é ainda pouco difundida. Spain (1988) aponta algumas barreiras à esta adoção, destacando: a inexistência de germoplasma adaptado para algumas regiões; conhecimento insuficiente sobre o manejo de pastos consorciados; e falta de credibilidade entre os especialistas (extensionistas, pesquisadores e professores) e usuários (pecuaristas e empresários da área de produção e comercialização de sementes), principalmente por fracassos ocorridos no passado.

A utilização incipiente de leguminosas e mesmo de outros gêneros de gramíneas forrageiras, que não pertençam aos de *Brachiaria* e *Panicum*, nos sistemas produtivos tropicais, não reflete a grande diversidade biológica disponível e avaliada nas instituições de pesquisa. Nos últimos trinta anos foram testados milhares de acessos com potencial forrageiro, pertencentes aos diversos gêneros de gramíneas e leguminosas. No banco de germoplasma do Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, localizado na Colômbia, estão armazenados 28.158 acessos de espécies tropicais com potencial forrageiro, a maioria de leguminosas. No Brasil, muitas introduções de leguminosas forrageiras tropicais foram testadas, especialmente as pertencentes aos gêneros *Arachis*, *Cajanus*, *Calopogonium*, *Centrosema*, *Desmodium*, *Leucaena*, *Neonotonia*, *Pueraria*, *Stylosanthes* e *Zornia*. Somente na Embrapa Cerrados, em Planaltina-DF, foram introduzidos e avaliados mais de 5.000 acessos de leguminosas com potencial forrageiro (Karia & Andrade, 1996).

Paradoxalmente, até junho de 2008, estavam registradas apenas 38 cultivares de leguminosas forrageiras tropicais pertencentes aos gêneros *Arachis* (duas cultivares),

Cajanus (dez), *Calopogonium* (uma), *Centrosema* (três), *Lablab* (syn. *Dolichos*) (três), *Leucaena* (nove), *Macroptilium* (uma), *Macrotyloma* (uma), *Neonotonia* (quatro), *Pueraria* (uma) e *Stylosanthes* (três) (Brasil, 2008b). Outras leguminosas tropicais foram lançadas antes da instituição do Registro Nacional de Cultivares (Portaria 527 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 31 de dezembro de 1997, publicado no D.O.U. de 07 de janeiro de 1998), porém, por não terem sido comercializadas após 1997, não foram registradas. Dessas 38 cultivares, estima-se que somente entre dez e quinze estão sendo efetivamente comercializadas, grande parte como adubo verde, segundo informações de produtores de sementes forrageiras vinculados a Unipasto (Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais).

A flora brasileira é extremamente rica em leguminosas e é, inclusive, centro de origem de diversas espécies que poderiam ser usadas no estabelecimento de pastagens. Dentre estas leguminosas nativas, destaca-se o gênero *Stylosanthes* (Edye et al., 1984; Karia & Andrade, 1996). O gênero possui várias espécies, amplamente distribuídas pelo continente americano, e apresenta grande variação de formas e tipos, resultantes da evolução de ecótipos submetidos às diferentes condições de clima, solos e pressões bióticas (Burt, 1984; Karia et al., 2002; Barros et al., 2005). A maioria das espécies é colonizadora e tem como habitat, regiões de baixa precipitação pluvial, com solos de baixa fertilidade natural, pobres em cálcio e fósforo e com elevado teor de alumínio (Paladines, 1974). Essas espécies também possuem grande potencial de utilização em outros sistemas agrícolas, seja como adubo verde, planta de cobertura das entrelinhas em culturas perenes, ou como planta para proteção do solo e recuperação de áreas degradadas (Cameron & Chakraborty, 2004). Apesar dessa ampla potencialidade, os trabalhos de avaliação e seleção têm sido realizados, basicamente, com o objetivo de se selecionarem genótipos para a alimentação animal sob pastejo.

Nas avaliações agronômicas realizadas na região do Cerrado, as espécies *Stylosanthes capitata* (Vogel), *Stylosanthes macrocephala* (Ferreira & Sousa Costa) e, principalmente, *Stylosanthes guianensis* [(Aubl.) Sw.] destacaram-se pela ampla adaptação e potencial forrageiro. A espécie *S. guianensis* possui genótipos que se sobressaem pela tolerância à seca, elevada produção de forragem, além de apresentarem alta diversidade fenotípica (Karia et al., 2002; Andrade et al., 2004). Apesar disso, no Brasil, apenas duas cultivares do gênero são atualmente comercializadas.

O Banco de Germoplasma da Embrapa possui mais de mil acessos registrados de *S. guianensis*; embora, provavelmente, muito disso seja mera duplicata, que, no passado, por falta de ferramentas de controle, foram introduzidos e reintroduzidos de instituições distintas. Isso, entretanto, ocorre com freqüência na maioria dos bancos de germoplasma do mundo (Peeters & Williams, 1984). Também, por falta de ferramentas adequadas, muitas informações sobre as avaliações agronômicas foram perdidas e a caracterização morfológica não foi realizada para grande parte desse material. Devido a esses problemas, há muita dificuldade na utilização desses acessos pelo melhoramento genético. Ademais, pouco se conhece sobre o potencial de outras formas de utilização da espécie, que não seja em alimentação animal (Andrade et al., 2004).

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar os acessos de *Stylosanthes guianensis*, existentes na Embrapa Cerrados e na Coleção de Base da Embrapa, para promover uma melhor utilização destes recursos genéticos. Mais especificamente, buscou-se: caracterizar os acessos dessa coleção, a partir de caracteres morfoagronômicos; estabelecer grupos de acessos com características morfoagronômicas semelhantes e inferir sobre o potencial de utilização de, pelo menos, alguns destes grupos; caracterizar os acessos da coleção por meio de marcadores moleculares; quantificar a variabilidade genética existente na coleção; verificar a existência de correlação entre a diversidade morfológica e a diversidade genética estimada por marcador molecular; e identificar possíveis duplicatas de acessos, utilizando-se os dados das caracterizações morfoagronômica e genético-molecular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *Stylosanthes* SW.

2.1.1 Distribuição natural, taxonomia e caracterização

O gênero *Stylosanthes* ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do continente americano, mas pode ser encontrado em um intervalo de 77° de latitude, entre 36°S a 41° N, ou seja, da Argentina aos Estados Unidos (Williams et al., 1984). Existem dois principais centros de diversidade do gênero na América, o primeiro situa-se no Brasil Central (Ferreira & Costa, 1979; Costa & Ferreira, 1984; Stace & Cameron, 1984), onde se observa o maior endemismo e a maior variação fenotípica inter e intraespecífica. Este centro inclui cerca de 45% das espécies do gênero. O segundo centro de diversidade corresponde à região formada pelo México e Caribe, na América Central (Stace & Cameron, 1984). Na África, ocorrem quatro espécies: *S. erecta*, *S. suborbiculata*, *S. sundaica* e *S. fruticosa*, esta última também encontrada na Península da Arábia, Índia, Sri Lanca e Madagáscar. Na Indonésia, Malásia, Tailândia e Timor ocorre *S. sundaica* (Costa, 2006).

De acordo com Costa (2006), são reconhecidas 48 espécies, das quais 44 são exclusivas do continente americano. No Brasil, ocorrem 29 espécies, sendo que treze delas são encontradas apenas em território nacional. Só no Estado de Minas Gerais são encontradas dezoito espécies (Costa & Ferreira, 1982). Neste país, atualmente, a utilização agrônômica se restringe a três espécies, *S. capitata*, *S. macrocephala* e *S. guianensis*, que apresentaram maior potencial agrônômico em avaliações conduzidas nos últimos trinta anos, especialmente na região do Cerrado (Karia & Andrade, 1996).

A espécie que possui distribuição mais ampla é *S. guianensis*, ocorrendo desde o México até a Argentina (Williams et al., 1984; Costa, 2006). No Brasil, foi encontrada nos Estados da Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, São Paulo, Tocantins e no Distrito Federal (Ferreira & Costa, 1979; Costa & Ferreira, 1984; Costa, 2006) (Figura 2.1).

caule, tamanho e formato dos folíolos e das inflorescências, tipo de venação e presença ou ausência de pilosidade nas vagens, e tamanho do apêndice terminal no artigo superior das vagens (Costa & Ferreira, 1982; Mannetje, 1984; Batistin & Martins, 1988; Costa, 2006). Atualmente, uma série de outras técnicas, envolvendo análises citológicas (Vieira et al., 1993) e moleculares, estão sendo utilizadas para auxiliar na taxonomia do gênero: eletroforese de proteínas de sementes (Robinson & Megarrity, 1975); eletroforese de isoenzimas (Robinson et al., 1980); RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Liu & Musial, 1995); RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Vieira et al., 1997); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Sawkins et al., 2001); ITS (*Internal Transcribed Spacer Region*) (Vander Stappen et al., 1998; Costa, 2006); STMS (*Sequence-Tagged Microsatellites Sites*) ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Vander Stappen et al., 1999a); e polimorfismo de cpDNA (seqüência de DNA de cloroplasto) (Vander Stappen et al., 1999b; Liu & Musial, 2001).

Segundo Maass & Sawkins (2004), apesar dos esforços em pesquisa, a taxonomia do gênero *Stylosanthes* é ainda bastante confusa. Os desencontros sobre a classificação das espécies eram bastante pronunciados, sobretudo, em *S. guianensis*. Mohlenbrock (1958) dividiu a espécie em duas subespécies, *S. guianensis* ssp. *guianensis* e *S. guianensis* ssp. *dissitiflora*. Mannetje (1984) considerou diversas variedades botânicas dentro da espécie: var. *guianensis*, var. *marginata*, var. *gracilis*, var. *intermedia*, var. *robusta*, var. *longiseta* e var. *dissitiflora*. Já Ferreira & Costa (1979) e Ferreira et al. (1985) consideram que *S. guianensis* é formada apenas pelos espécimes que são classificados por Mannetje (1984), como *S. guianensis* var. *guianensis*. Consideram, ainda, que a espécie esteja dividida em quatro variedades botânicas: var. *canescens*, var. *microcephala*, var. *pauciflora* e var. *vulgaris*. Os trabalhos mais recentes, utilizando polimorfismo de DNA, demonstram que a classificação inicial de Ferreira & Costa (1979) era a mais adequada (Maass & Sawkins, 2004).

Buscando-se esclarecer tal confusão, Costa (2006) utilizou três técnicas para auxiliar a classificação das espécies: o método dicotômico tradicional; os descritores da morfologia externa das plantas, aliados à taxonomia numérica; e a filogenia molecular, utilizando-se seqüências do espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (ITS). As amostras de plantas para avaliação foram obtidas em herbário e, também, em expedições de coleta no Brasil. Como resultado desse trabalho, o autor propôs uma nova chave de classificação, justificou o reconhecimento e as rejeições das espécies e descreveu todas as

espécies reconhecidas do gênero. Enfim, esse foi o estudo taxonômico mais completo já feito em *Stylosanthes*, que esclarece vários pontos, até então, tidos como muito confusos.

Com relação à espécie *S. guianensis*, o autor considerou correta a classificação de Ferreira & Costa (1979) e Ferreira et al. (1985), com as quatro variedades botânicas. Apenas alterou a nomenclatura da variedade *vulgaris* para variedade *guianensis*, pois esta última foi publicada antes da primeira. As demais variedades, classificadas por Manetteje (1984), foram consideradas como espécies diferentes: *S. acuminata*, *S. gracilis*, *S. campestris*, *S. hippocampoides*, *S. grandifolia*, *S. aurea* e *S. longiseta*. Devido a essa antiga indefinição, freqüentemente se observa, na literatura, o termo “complexo *S. guianensis*”, para definir o conjunto de plantas dessas espécies e, ou, variedades.

O porte das plantas do gênero varia de herbáceo a subarborescente, podendo ser ereto, semiprostrado ou prostrado. No mesmo gênero há espécies anuais, como *S. humilis*, e perenes, como *S. guianensis*, *S. scabra*, *S. capitata* e *S. macrocephala*. As folhas são trifolioladas e a inflorescência é do tipo espiga. As flores são protegidas por brácteas e bractéolas, e suas cores, em geral, variam de amarelo a alaranjadas. Algumas espécies apresentam estrias purpúreas nas flores. Outras, como *S. acuminata* e algumas variedades de *S. guianensis*, podem possuir flores brancas. Como característica típica da subfamília *Papilionoideae*, a corola das flores apresenta pré-floração vexilar, composta de um estandarte, duas asas e uma quilha. O androceu é formado por dez estames monoadelfos, e o gineceu possui ovário súpero, monocarpelar, com um ou dois óvulos, estilo alongado e glabro, dotado de estigma terminal. O fruto é uma vagem do tipo lomento, com um ou dois artículos férteis e um apêndice terminal persistente no ápice (estilete residual), o qual varia de tamanho conforme a espécie. Este é bem visível em *S. humilis*, *S. leiocarpa*, *S. bracteata* e *S. linearifolia*, mas pouco visível em *S. guianensis*. (Ferreira & Costa, 1979).

As sementes, sempre com algum grau de dormência, possuem ampla variabilidade para este caráter, que, entre e dentro das espécies de *Stylosanthes*, é controlado por fatores genéticos e ambientais (Reis & Martins, 1986). Dentro do gênero existem duas formas de dormência (McKeon & Mott, 1984): dormência endógena ou embrionária, em que a embebição das sementes para a germinação ocorre quando a temperatura ótima se estabiliza; e dormência exógena ou dureza da semente, em que a semente é revestida por uma camada impermeável que impede a embebição das sementes. Nas cultivares brasileiras, a dormência pela dureza da semente é a mais comum, de modo que, para a semeadura, sempre é necessário escarificar as sementes. Esse procedimento é

feito pelas empresas de produção de sementes, de tal forma que estas são comercializadas já prontas para o plantio (Karia et al., no prelo).

O número básico de cromossomos dentro do gênero é $n=10$ e observa-se que todas as espécies da seção *Stylosanthes* são diplóides. Existem, portanto, espécies diplóides ($2n=20$), como *S. guianensis*, *S. humilis*, *S. macrocephala* e *S. viscosa*; espécies alotetraplóides ($4n=40$), como *S. capitata*, *S. fruticosa* e *S. scabra*; e também uma espécie alohexaplóide ($6n=60$), *S. erecta* (Stace & Cameron, 1984). Dados isoenzimáticos (Stace, 1984) e de biologia molecular (Vander Stappen et al., 1999b) sugerem que *S. macrocephala* deu origem à *S. capitata*. Outros estudos apontam *S. macrocephala* ou *S. bracteata* como possíveis doadoras maternas e *S. pilosa* como doador paterno do genoma de *S. capitata* (Maass & Sawkins, 2004).

Em comparação com outras leguminosas tropicais, a fisiologia do florescimento de *Stylosanthes* é bastante conhecida. As espécies variam quanto ao período juvenil e, também, quanto à resposta ao fotoperíodo. Respostas a dias curtos, dias longos, a dias longos-curtos ou mesmo neutros são encontrados dentro do gênero (Ison & Humphreys, 1984); e essa variação pode ocorrer também entre populações de uma mesma espécie, como em *S. guianensis* (Trongkongsin & Humphreys, 1987). Normalmente, as plantas apresentam uma fase juvenil, ou seja, necessitam de determinado período de crescimento ou de acúmulo de matéria seca, antes de estarem aptas para responder ao estímulo fotoperiódico. Em *S. guianensis* verificou-se que o comprimento da fase juvenil difere entre as variedades (Ison & Humphreys, 1984).

Quanto à biologia da reprodução, todas as espécies são predominantemente de autopolinização. Entretanto, é comum certa taxa de polinização cruzada, que é um componente importante para a manutenção das populações na natureza (Stace, 1984). Miles (1983), utilizando um marcador morfológico (estípula pilosa ou glabra), em experimento realizado na Colômbia, detectou taxas de cruzamento natural de até 20%, em *S. capitata*. Em *S. guianensis* var. *vulgaris*, Miles (1985), utilizando a coloração da flor como marcador morfológico (amarela dominante sobre branca), em experimento de campo, com doze plantas homozigotas para flor branca, concluiu que a taxa de cruzamento natural foi de 13,8%. Stace (1982) detectou uma taxa de cruzamento natural de 1% a 2%, em uma população australiana de *S. scabra*, utilizando-se o marcador isoenzimático ADH (álcool dehydrogenase). Essa variação na porcentagem de cruzamento natural é

determinada por fatores genéticos e, principalmente, pelo número e comportamento de insetos polinizadores presentes no local (Stace, 1982; Miles, 1985).

Costa (2006) redescreveu a espécie *S. guianensis* como planta perene, de porte herbáceo a subarbutivo, de prostrada a ascendente, até a ereta. O caule varia de glabro, glabrescente a piloso-setoso-viscoso. Os folíolos, de elípticos a oblongos, agudos na base, agudos ou obtusos na extremidade, acuminados no ápice, também variando de glabros, glabrescentes a piloso-setoso-viscosos, apresentam de três a sete pares de nervuras, discretas. As inflorescências terminais ou axilares possuem de oito a trinta flores, globosas ou em taça, simples, formadas por uma única espiga ou compostas por duas ou mais espigas, com cinco a vinte milímetros de comprimento; as brácteas, imbricadas, são freqüentemente trifolioladas externamente e, internamente, unifolioladas, glabrescentes ou freqüentemente piloso-setosas, por vezes viscosas, com três a cinco pares de nervuras. O lomento é uniarticulado, subelipsóide, com retículo pouco evidente e escuro; seu tegumento é de textura suave e fina (única no gênero) e o tecido produtor de óleo essencial está próximo à base; o rostro é curto, com até 0,2 mm, curvo e deitado. A semente é amarela ou preta, e elipsóide.

Devido à sua ampla distribuição geográfica, com ocorrência em diversos ecossistemas, a espécie *S. guianensis* apresenta grande diversidade fenotípica. No Distrito Federal, foram caracterizados 350 acessos, coletados em diversos países da América Latina, pertencentes às quatro variedades botânicas, e a diversidade fenotípica observada entre os acessos foi bastante ampla (Karia et al., 1997). Nesse estudo, as plantas apresentaram-se pouco ramificadas (cinco a seis ramificações primárias, inseridas até a altura de 10 cm do solo) a muito ramificadas (até dezenove ramificações primárias), com comprimento do folíolo central variando de 1,1 cm a 5,8 cm e início da maturação dos frutos ocorrendo entre os meses de março e julho. As quatro variedades de *S. guianensis* estão caracterizadas nos trabalhos de Ferreira & Costa (1979), Ferreira et al. (1985) e em Costa (2006).

S. guianensis var. *canescens* é um subarbusto semi-ereto, com caules, estípulas e brácteas cobertas por pêlos claros e pubescentes, porém, sem cerdas. Seus folíolos são lanceolados, de ápice agudo, com seis ou sete pares de nervuras. As espigas são achatadas, de obovadas a ligeiramente triangulares, axilares e terminais. As brácteas são unifolioladas, com sete a nove nervuras. O lomento é reticulado e, como em toda a espécie, apresenta

apenas um artículo fértil, com o estilete residual muito curto. As sementes são amarelas e, por vezes, pretas.

Em *S. guianensis* var. *guianensis* (syn. *S. guianensis* var. *vulgaris*), as plantas são eretas, com caules, estípulas e brácteas cobertas por pêlos simples e cerdas. Seus folíolos são lanceolados, piloso-cerdosos, com cinco a sete pares de nervuras (Figura 2.2 - A); as brácteas, unifolioladas, apresentam folíolo residual muito desenvolvido; as espigas são globóides, multifloras, axilares e terminais (Figura 2.2 - B). O lomento é reticulado e glabro; e a semente é oblonga, amarela, podendo variar de castanho a preta (Ferreira & Costa, 1979; Costa, 2006).



Foto: Cláudio Takao Karia



Foto: Allan Kardec Braga Ramos

Figura 2.2. *Stylosanthes guianensis* var. *guianensis*, cultivar Mineirão – plantas em fase vegetativa (A) e detalhe da inflorescência (B).

S. guianensis var. *microcephala* ocorre somente no Brasil e é a variedade mais fácil de se distinguir. Suas plantas são prostradas e ramificadas; os folíolos são menores do que nas demais variedades, lanceolados, com cinco a sete pares de nervuras, pilosos ou glabros. As estípulas e brácteas também são pilosas, as espigas são pequenas, com poucas flores, axilares e terminais. O lomento é reticulado e glabro, e as sementes são amarelas (Ferreira & Costa, 1979; Costa, 2006).

S. guianensis var. *pauciflora*, conhecida comumente por “estilosantes tardio”, apresenta planta perene, caules, em geral, lenhosos, com haste única, ramificados, pilosos e com cerdas curtas, densas e viscosas, por vezes. Seus folíolos são oblongos, agudos na

base, agudos e mucronados no ápice, piloso-setoso-viscosos nas duas páginas, ou pubescentes na página superior e piloso-setosos na inferior. As inflorescências são formadas por espigas simples, obovóides, obcônicas ou em taça, multifloras, com cinco a dez flores por espiga ou compostas de duas ou três espigas. O lomento, só com o artículo superior fértil, é glabro. A semente, em geral, é amarela (raramente preta), elipsóide em vista frontal e sub-reniforme em vista lateral (Ferreira et al., 1983; Costa, 2006). Essa variedade, em geral, apresenta populações mais tolerantes à antracnose, embora com baixa produção de sementes.

2.1.2 Utilização e principais cultivares

Algumas espécies do gênero *Stylosanthes* são utilizadas há milhares de anos como planta medicinal. Segundo Bah et al. (2006), *Cissus quadrangularis* e *S. erecta* são as espécies mais freqüentemente utilizadas na medicina popular em Mali, para combater a esquistossomose. O chá de folhas ou da parte aérea moída de *S. erecta*, misturadas com raízes de *Calotropis procera* ou frutos de *Tamarindus indica*, ou ainda, com parte aérea de outras plantas, é bastante utilizado para combater a forma urinária dessa moléstia, em várias regiões do noroeste africano. Na Índia, plantas de *S. fruticosa* são utilizadas também na medicina popular, como analgésico e antiinflamatório, porém, esse efeito não foi confirmado por Malairajan et al. (2006).

Como forrageira, a Austrália foi o primeiro país a reconhecer o valor dessas espécies, e os registros sobre o uso de *S. humilis* naquele país datam de 1914 (Edye, 1997). Durante o início do século 20, a espécie foi introduzida acidentalmente e se naturalizou, cobrindo extensas áreas de savanas tropicais semi-áridas naquele país. A dispersão dessa espécie ocorreu naturalmente e, também, pelo estabelecimento por fazendeiros. Por volta de 1970, estimava-se que a espécie havia se dispersado, naturalmente, em meio milhão de hectares na região semi-árida da Austrália; além disso, ocupava mais algumas dezenas de milhares de hectares de pastagens cultivadas (Miller et al., 1997). A espécie ficou conhecida como *Townsville stylo* ou *Townsville lucerne* (alfafa de *Townsville*).

No início da década de 1940, foi liberada a cultivar Schofield de *S. guianensis*, para a utilização na região tropical úmida da Austrália. Esta é considerada a primeira variedade cultivada de estilosantes, liberada como produto da pesquisa; embora sementes de *S. humilis*, naturalizadas, tenham sido comercializadas anteriormente. No início da

década de 1970, com a chegada do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, extensas áreas de *S. humilis* foram devastadas pela antracnose. A partir dessa época, foi ampliada a pesquisa com *S. guianensis* e outras espécies, como *S. hamata* e *S. scabra*, o que resultou na liberação de diversas cultivares, o que permitiu a permanência do gênero no sistema de produção (Miller et al., 1997).

No Brasil, espécies de *Stylosanthes* são conhecidas vulgarmente como trifólio, meladinho, manjericão do campo, saca-estepe, alfafa do nordeste (Brasil, 1937) e, mais recentemente, como estilosantes. Segundo Edye (1997), o valor forrageiro dessa planta, no Brasil, foi reconhecido em 1933; entretanto, na publicação *Informações sobre algumas plantas forrageiras* (Brasil, 1937), há relato de que, em 1926, foi editado pela Imprensa Oficial do Estado de Pernambuco um folheto sobre a alfafa do nordeste, escrito por D. Bento Pickel. Naquela época, já se dizia que a alfafa do nordeste era “muito apreciada pelo gado *vacum* e *cavallar*” e ressaltava-se o potencial de sua utilização na produção animal.

Em 1933, as primeiras sementes da alfafa de *Townsville* (*S. humilis*) chegavam ao Brasil, recebidas do Departamento de Agricultura e Pecuária de Queensland, pelo Departamento Nacional da Produção Animal do Ministério da Agricultura. Naquela ocasião, a classificação botânica gerara dúvidas e essa introdução foi registrada como *S. mucronata* ou *S. sudaica*. Tais sementes foram enviadas para a estação experimental de Deodoro, no Rio de Janeiro (Distrito Federal, na época), para as avaliações agrônômicas, onde já haviam sido relatados intensos ataques de antracnose, em estilosantes (Brasil, 1937). Posteriormente, dois acessos de *S. guianensis*, coletados no Estado do Rio de Janeiro, foram recomendados para uso forrageiro, no Brasil, com os nomes de cultivar Deodoro e cultivar Deodoro II; entretanto, suas sementes não chegaram a ser comercializadas (Thomas & Grof, 1986). De qualquer forma, estas são consideradas as primeiras cultivares brasileiras de *Stylosanthes*.

No início da década de 1970, quando houve grande incentivo governamental para a formação de pastagens no Brasil Central, foi grande o interesse pela consorciação de pastos, formados por gramíneas e leguminosas, haja vista o sucesso dessa prática na Austrália, país considerado modelo para a atividade pecuária nas regiões tropicais do mundo. Sementes das cultivares australianas Schofield, Cook e Endeavour, de *S. guianensis*, foram importadas em grande volume e recomendadas pelos órgãos oficiais de extensão rural do Brasil, sem, entretanto, terem sido testadas para as condições brasileiras. Nessa época, também foi utilizada a cultivar IRI 1022 (*S. guianensis* var. *canescens*),

originária de germoplasma coletado no Estado de São Paulo e liberada pelo Instituto de Pesquisas IRI (anteriormente IBEC Research Institute), entre 1965 e 1970 (Andrade & Karia, 2000). Esta foi a primeira cultivar brasileira a ser, efetivamente, comercializada, tendo permanecido no mercado até o final da década de 1970 (Andrade et al., 2004).

A divulgação e uso de *S. guianensis*, naquele período, quando ainda não havia preocupação com a antracnose, resultou num grande insucesso, pois não existia, na Austrália, a variabilidade genética do fungo que ocorre no Brasil. Logo, todas as cultivares importadas eram muito susceptíveis à doença. Com o aumento da área cultivada, o fungo espalhou-se rapidamente e, assim, o estilozante foi dizimado pelo ataque da doença. Reflexos desses insucessos são sentidos até hoje e podem ser uma das principais explicações para a resistência de muitos produtores à utilização de leguminosas nesse tipo de atividade (Spain & Vilela, 1990).

Foi a partir da Austrália que as cultivares de espécies de estilozantes se difundiram pelos países tropicais e subtropicais. Entretanto, do final da década de 1970 até meados da década de 1990, o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) iniciou um intenso programa para o desenvolvimento de pastagens tropicais. Esse programa consistia em coleta e intercâmbio de germoplasma, avaliação e seleção de forrageiras tropicais, e treinamento de pesquisadores para a formação de equipes, que trabalhassem em conjunto e sob a coordenação do CIAT (Andrade et al., 2004). Esse programa ficou conhecido internacionalmente como RIEPT (*Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales*), tendo sido fundamental para o crescimento das pesquisas e da oferta de recursos genéticos em *Stylosanthes* e outras forrageiras tropicais (Andrade & Karia, 2000).

Com o trabalho da RIEPT e dos centros de pesquisa australianos, a oferta e a especificidade de cultivares aumentaram, de modo que já se contabilizam 37 genótipos disponibilizados ou recomendados em todo o mundo (Tabela 2.1). Alguns genótipos foram comercializados com nomes distintos nos diversos países, como é o caso do *S. guianensis* cv. Pucallpa, lançado no Peru; comercializado na China, inicialmente, como Pia Hua Dou 184 e, posteriormente, como Reyan 2 – Zhuhuacao; na Tailândia como Tha Phra; e, em outros países, como Malásia e Indonésia, como CIAT 184. Por outro lado, existem cultivares que são semeadas em diversos países e comercializadas com o mesmo nome, como é o caso da cultivar australiana Verano, de *S. hamata*, usado na Malásia, Tailândia, Indonésia, Índia e China (Hall & Glatzle, 2004; Pathak et al., 2004; Phaikaew et al., 2004).

Tabela 2.1. Cultivares de espécies do gênero *Stylosanthes*, por países e anos em que foram liberadas comercialmente.

Espécie	Cultivar	País	Ano	Referência
<i>S. guianensis</i>	Bandeirante	Brasil	1983	Sousa et al. (1983a)
	Bela ¹	Brasil	-	Brasil (2008b)
	Cook	Austrália	1971	Barnard (1972)
	Deodoro	Brasil	Pré-1937	Loch & Ferguson (1999)
	Deodoro II	Brasil	? ²	Loch & Ferguson (1999)
	Endeavour	Austrália	1971	Barnard (1972)
	Grahan	Austrália	1980	Register... (1980a)
	IRI 1022	Brasil	1970?	Loch & Ferguson (1999)
	Mineirão	Brasil	1993	Embrapa Cerrados (1998)
	Nina	Austrália	2003	Southedge Seeds (2003)
	Pucallpa ³	Perú	1985	Loch & Ferguson (1999)
	Reyan 5	China	2000	Guodao et al. (2002)
	Reyan 7	China	2000	Guodao et al. (2004)
	Reyan 10	China	2001	Guodao et al. (2002)
	Reyan 13	China	2003?	Guodao et al. (2004)
	Savanna	EUA	1992	Williams et al. (1993)
	Schofield	Austrália	1933?	Barnard (1972)
	Temprano	Austrália	2003	Southedge Seeds (2003)
	907	China	2003?	Guodao et al. (2004)
	<i>S. capitata</i>	Capica	Colômbia	1982
<i>S. capitata</i> + <i>S. macrocephala</i>	Campo Grande	Brasil	2000	Embrapa Gado de Corte (2000)

Continua...

Tabela 2.1. Cont.

Espécie	Cultivar	País	Ano	Referência
<i>S. hippocampoides</i> (= <i>S. guianensis</i> var. <i>intermedia</i>)	Comum	Austrália	1965	Loch & Ferguson (1999)
	Oxley	Austrália	1969	Barnard (1972)
<i>S. hemihamata</i> (= <i>S. hamata</i>)	Amiga	Austrália	1988	Eyles (1989)
	Verano	Austrália	1973	Register... (1975)
<i>S. humilis</i>	Comum	Austrália	pré-1914	Loch & Ferguson (1999)
	Gordon	Austrália	1968	Barnard (1972)
	Khon Khaen	Tailândia	1984	Loch & Ferguson (1999)
	Lawson	Austrália	1968	Barnard (1972)
	Paterson	Austrália	1969	Barnard (1972)
<i>S. macrocephala</i>	Pioneiro	Brasil	1983	Sousa et al. (1983b)
<i>S. scabra</i>	Fitzroy	Austrália	1980	Register... (1980b)
	Q10042	Índia	1995	Loch & Ferguson (1999)
	Seca	Austrália	1976	Register... (1978)
	Siran	Austrália	1990	Loch & Ferguson (1999)
<i>S. seabrana</i>	Primar	Austrália	1996	Edye et al. (1998)
	Unica	Austrália	1996	Edye et al. (1998)

¹ Cultivar em pré-lançamento, já incluída no Registro Nacional de Cultivares, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasil.

² O ponto de interrogação significa que o ano de lançamento é desconhecido. Quando acompanhado pelo ano, significa se tratar de uma estimativa, pois não há registro oficial do ano de lançamento ou da liberação comercial.

³ Também lançada na China, inicialmente, como Pia Hua Dou 184 (He & Schultze-Kraft, 1988) e, posteriormente, como Reyan II - Zhuhuacao (Loch & Ferguson, 1999); e na Tailândia, como Tha Phra (Loch & Ferguson, 1999).

Em síntese, no Brasil, além das cultivares australianas, importadas na década de 1970, já foram recomendadas ou lançadas sete cultivares (Deodoro, Deodoro II, IRI 1022, Bandeirante, Pioneiro, Mineirão e Campo Grande), e outra (cultivar Bela) encontra-se em fase de pré-lançamento (Tabela 2.1). É importante registrar que todas estas foram avaliadas e selecionadas em condições brasileiras.

S. guianensis var. *pauciflora* cv. Bandeirante é planta perene, semi-ereta, com altura média de 65 cm e que produz em torno de 2.500 kg.ha⁻¹.ano de matéria seca, com teor médio de proteína bruta de 12%. A cultivar Bandeirante apresenta excelente resistência à seca, mantendo-se verde durante o período seco, mesmo no nordeste da região do Cerrado, onde a precipitação pluviométrica é menor e mais concentrada. Apresentou-se com bastante tolerância à antracnose, principalmente em pasto consorciado e em banco de proteína (Sousa et al., 1983a). A produção de sementes, porém, é considerada baixa quando comparada às cultivares australianas da espécie. Assim, a utilização dessa cultivar foi mínima devido ao desinteresse pela produção comercial de suas sementes (Andrade & Karia, 2000).

A cultivar Pioneiro de *S. macrocephala* foi coletada na área experimental da Embrapa Cerrados, em Planaltina-DF, em 1974. Nos ensaios em rede nacional, conduzidos em onze locais, esta cultivar apresentou resistência à antracnose em oito locais, mas foi susceptível em Roraima, Amapá e Piauí. Experimentos em pastejo, com bovinos, em Planaltina-DF, mostraram que a presença de plantas desta cultivar, em consorciação com gramíneas, aumentou os teores de nitrogênio e de cálcio na forragem disponível para os animais e, também, a produção de carne por hectare (Sousa et al., 1983b). Apesar do seu grande potencial de utilização e da relativa facilidade em produzir suas sementes, na época do lançamento desta cultivar, também não houve interesse dos produtores de sementes em produzir e comercializar o produto (Andrade & Karia, 2000).

Em 1993, a Embrapa Cerrados e a Embrapa Gado de Corte liberaram a cultivar Mineirão, de *S. guianensis* var. *guianensis* (= var. *vulgaris*). Essa cultivar, coletada no Estado de Minas Gerais, próximo a Belo Horizonte, é perene, semi-ereta, podendo atingir 2,5 m de altura. Possui caules grossos na base, folíolos lanceolados, medindo de 2,0-5,0 cm de comprimento e 0,4-0,8 cm de largura, com 5-7 pares de nervuras (Embrapa Cerrados, 1998). Os caules e folhas possuem viscosidade, que se acentua na seca. Da mesma forma que a cultivar Bandeirante, permanece verde durante o período seco. Dentre as cultivares

existentes no mercado brasileiro, Mineirão é a que mais produz biomassa, em solos de baixa fertilidade, além de ser a mais tolerante à antracnose (Figura 2.2).

Em geral, o consumo da cultivar Mineirão pelos animais é maior no período seco do ano, quando a planta ainda apresenta até 12% de proteína bruta na parte aérea. No período chuvoso, quando em consorciação, os animais preferem consumir a gramínea, embora o teor de proteína bruta do estilosantes Mineirão seja, em média, de 18%. Quando semeada em outubro-novembro, floresce em maio-junho e a produtividade de sementes, em campos de produção comercial, varia de 30 kg.ha⁻¹ a 60 kg.ha⁻¹, embora, em condições irrigadas, já se tenha registrado produtividades de até 120 kg.ha⁻¹, no Distrito Federal. A semente é de cor escura e de tamanho pequeno, sendo que um grama contém 360 sementes (Embrapa Cerrados, 1998).

Em provas regionais, essa cultivar mostrou excelente adaptação e desempenho, de Roraima até São Paulo e Mato Grosso do Sul. É recomendada para a formação de pastagem consorciada e como banco de proteína, em associação com culturas anuais e em áreas de recuperação de pastagem (Embrapa Cerrados, 1998). Pode permanecer até quatro anos na pastagem, mas sua ressemeadura natural é muito baixa ou inexistente em condições de pastejo. Assim, o manejo da pastagem deve ser feito de modo a preservar as plantas inicialmente estabelecidas. Este genótipo ainda é comercializado no Brasil, embora o preço de suas sementes seja considerado alto pelos pecuaristas. Em testes agrônômicos na China, a cultivar demonstrou também excelente desempenho, ficando em primeiro lugar numa competição com quatorze genótipos, superando as cultivares locais Reyan 2 e Reyan 5 (Changjun et al., 2004).

Em 2000, foi liberada a cultivar Campo Grande, desenvolvida pela Embrapa Gado de Corte. Essa cultivar é uma mistura física de sementes, com 80% (em peso) de linhagens de *S. capitata*, tolerantes à antracnose, e 20% de linhagens de *S. macrocephala*. Originou-se de plantas sobreviventes de um antigo campo de seleção de acessos de *Stylosanthes*, localizado na fazenda Maracujá, em Campo Grande (MS), que, após o término do experimento, foi submetido ao manejo normal da fazenda. Após vários anos, as plantas sobreviventes, selecionadas naturalmente, apresentaram-se altamente vigorosas e tolerantes à antracnose (Milles & Grof, 1997). Posteriormente, dez novos acessos de *S. capitata* e cinco de *S. macrocephala*, pré-selecionados na Embrapa Gado de Corte para produtividade de forragem e de sementes, e com alta resistência à antracnose, foram semeados em linhas intercaladas com sementes colhidas na fazenda Maracujá, para o

cruzamento entre plantas da mesma espécie. As sementes colhidas de cada espécie foram novamente semeadas no ano seguinte, repetindo-se o procedimento durante seis gerações. Após esse período, as sementes de cada espécie foram colhidas separadamente, e, posteriormente, reunidas na proporção de 4:1 (*S. capitata* : *S. macrocephala*). Essa população de plantas foi, então, submetida às avaliações necessárias para atestar a sua superioridade, incluindo-se ensaios sob pastejo (Lascano & Pizarro, 1984), culminando na cultivar Campo Grande (Embrapa Gado de Corte, 2000).

A estratégia de se utilizar conjuntamente várias linhagens teve como objetivo evitar a pressão de seleção do patógeno da antracnose sobre um genótipo único e, dessa forma, dificultar a quebra da resistência à doença. Apesar de a cultivar ser composta por linhagens geneticamente diferentes, estas linhagens possuem certas características fenotípicas uniformes, como em altura de plantas, época de florescimento e produção de sementes (Karia et al., no prelo).

O florescimento nessa cultivar ocorre a partir da segunda quinzena de abril, nas condições de Campo Grande, e a maturação das sementes, no final da segunda quinzena de maio. Após a maturação dos frutos, ocorre a queda das inflorescências e folhas. Muitas vezes, após a produção de sementes a planta morre. Portanto, a sua contribuição na produção de forragem, durante a época seca, é baixa. Em geral, as plantas sobrevivem no máximo por dois anos, em condições de pastejo. Logo, a manutenção da cultivar na pastagem se dá pela ressemeadura natural, principalmente em solos arenosos, onde a sobrevivência das novas plantas, no início do período chuvoso, é maior. Assim, o manejo do pastejo em consórcio deve ser feito de modo a beneficiar as plantas jovens, buscando-se minimizar a sua competição com a gramínea. Portanto, no período de outubro a dezembro, quando houver a emergência e o estabelecimento de novas plantas, os pastejos devem ser mais intensos, de forma a deixar maior espaço para as novas plantas da leguminosa (Embrapa Gado de Corte, 2000).

A produção de forragem dessa cultivar, nas condições do Mato Grosso do Sul, atinge 14 t.ha⁻¹.ano de matéria seca (MS), com teor de proteína entre 12% e 18% e digestibilidade da MS *in vitro* entre 55% e 60%. Possui alta produção de sementes, acima de 200 kg.ha⁻¹, permitindo que o preço de suas sementes seja bastante inferior ao da cultivar Mineirão. Porém, a produção de forragem na época seca do ano é menor na cultivar Campo Grande, sobretudo nas condições do Cerrado do Distrito Federal, no norte dos Estados de Goiás e Minas Gerais, e no sudoeste da Bahia.

Estima-se que, no auge da utilização da cultivar Mineirão, a área cultivada tenha chegado a 30 mil hectares. Posteriormente, com a divulgação da cultivar Campo Grande, cujo preço das sementes é aproximadamente um terço daquele alcançado pelas sementes da cultivar Mineirão, algumas empresas comercializaram uma mistura das duas cultivares, em proporções variadas. A mistura de cultivares, uma estratégia comercial para facilitar a venda de sementes da cultivar com preço mais elevado, é uma prática bastante utilizada em outros países, sobretudo na Austrália. Com essa estratégia é possível que a área com Mineirão tenha aumentado, porém não se sabe se essa cultivar sobreviveu nas pastagens consorciadas, pois o seu mecanismo de persistência, por ressemeadura natural, é inferior ao da cultivar Campo Grande (Karia et al., no prelo).

A área semeada com a cultivar Campo Grande, em 2004, foi estimada em 120 mil hectares (Yassu & Campos, 2004); e, em 2005/2006, a estimativa era de 150 mil hectares de área plantada. Na safra de 2006/2007, com a maior divulgação do produto em vários meios de comunicação de massa, as vendas de sementes, até novembro de 2006, atingiram 500 toneladas. Considerando-se a taxa de semeadura de 3 kg.ha⁻¹ e as vendas futuras, a estimativa de novas áreas de cultivo, na safra em questão, foi de 160 mil a 200 mil hectares (Embrapa Gado de Corte, dados ainda não publicados).

Se compararmos à área total de pastagens no Brasil, a área estimada com estilosantes, aproximadamente 300 mil hectares, é reduzida. Porém, esta supera a área de diversas culturas de grãos cultivadas na safra 2008, como a de amendoim em casca (soma da primeira e da segunda safra), cevada, mamona, tritcale e girassol, que foram, em mil hectares, de 115,2, 90,9, 151,7, 78,4 e 90,1, respectivamente (IBGE, 2008a). Este é um bom começo, considerando-se que a prática da utilização de leguminosas na alimentação animal ainda é pouco difundida no Brasil.

O aprimoramento no desenvolvimento de cultivares, o aumento do custo da terra e de insumos, e a pressão da sociedade sobre processos produtivos que degradam o meio ambiente deverão favorecer a adoção de leguminosas nas próximas décadas. A oferta de boas cultivares, desenvolvidas em parceria com a iniciativa privada, deve, assim, ser um caminho a ser perseguido para não se repetirem erros do passado e evitar um novo ciclo de descrença nessa tecnologia. Informações ainda mais detalhadas sobre o gênero *Stylosanthes*, com sua caracterização agrônômica e formas de utilização das principais cultivares, são apresentadas por Karia et al. (no prelo).

2.2 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE BANCOS DE GERMOPLASMA

2.2.1 Aspectos gerais da caracterização de germoplasma

Uma vez introduzidos num banco de germoplasma, os acessos das espécies vegetais devem ser caracterizados e avaliados, caso contrário, terão pouca utilidade. A caracterização e a avaliação dos materiais introduzidos são necessárias para se gerarem informações sobre as características morfológicas, fisiológicas, agronômicas, bem como sobre a tolerância a estresses e outros atributos importantes para os acessos de cada espécie. Essas características irão auxiliar na escolha dos acessos potencialmente interessantes para a utilização em programas de seleção e melhoramento genético (Idris & Saad, 2001).

A caracterização e a avaliação, além de gerarem informações sobre cada acesso, também têm como objetivos: mensurar a variabilidade genética e fenotípica presente na coleção, investigar a estrutura genética e fenotípica da coleção, e identificar genes especiais ou alelos raros. Os resultados desses estudos poderão ser utilizados para identificar a necessidade ou não de se agregar mais materiais ao banco de germoplasma, selecionar materiais ou grupos de materiais interessantes para o melhoramento genético, identificar duplicatas e, ou, materiais muito semelhantes (Engels & Visser, 2003). Agregando-se os dados dos sítios de coleta dos acessos, também é possível identificar locais de grande diversidade (*hot spots*), locais em que a coleta deve ser intensificada e aqueles cuja amostragem realizada já foi suficiente, além de possibilitar a investigação da influência ambiental sobre a variabilidade genética e fenotípica (Hidalgo, 2003).

Segundo Hidalgo (2003), a variabilidade de uma espécie pode ser agrupada em duas grandes classes: a que se expressa em características visíveis e que compõem o fenótipo, e a que não se expressa em características visíveis a olho nu e que, em geral, se refere aos processos ou produtos internos da planta. O autor ressalta que muitos processos dessa última classe estão sendo identificados mediante técnicas de biologia molecular, como o uso dos marcadores de DNA, que ainda não são rotineiras na maioria dos bancos de germoplasma.

No processo de caracterização e avaliação de acessos, consideram-se cinco etapas subseqüentes e correlacionadas: a correta identificação botânica, a elaboração de cadastro, a caracterização, a avaliação agronômica preliminar e a avaliação complementar

(Valls, 1988). O responsável por essas atividades é o curador do germoplasma, que além de coordenar todas as ações pertinentes ao produto, deve agregar uma equipe multidisciplinar para conduzir as avaliações e, também, organizar e disponibilizar as informações sobre os acessos (Valls, 1988; Idris & Saad, 2001; Nass, 2001)

A caracterização é realizada utilizando-se dados, sobretudo qualitativos, que devem descrever e, com isso, diferenciar os acessos de uma coleção de uma mesma espécie ou de espécies correlatas. Para isso, devem ser utilizados descritores estáveis, de alta herdabilidade, nos níveis morfológicos, bioquímicos ou moleculares (Valls, 1988; Idris & Saad, 2001; Nass, 2001; Ferreira et al., 2007; Valls, 2007).

Nas caracterizações morfológicas, além de estáveis, os descritores devem ser de fácil mensuração e a quantidade deles não deve ser muito grande, pois em geral, as coleções possuem muitos acessos, o que tornaria o processo muito trabalhoso (Idris & Saad, 2001; Nass, 2001; Valls, 2007). Percebe-se, então, que o trabalho de elaboração de listas de descritores é bastante complexo e exige recursos numerosos, considerando-se a necessidade de se repetirem ensaios em vários locais ou mesmo em vários anos, buscando-se selecionar características estáveis. Felizmente, para a maioria das espécies de importância econômica, essas listas já estão disponíveis. Na página eletrônica da Bioversity International, antigo IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) e IBPGR (International Board of Plant Genetic Resources), vinculado ao CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research), há listas completas de descritores para diversas espécies, incluindo milho, sorgo, trigo, cevada, lentilha, soja, amendoim, feijão, arroz, abacate, uva, citrus, banana, abacaxi, alfafa, trevo branco, entre outras (<http://www.bioversityinternational.org/scientific_information/themes/germplasm_documentation/crop_descriptors/>).

Para as espécies do gênero *Stylosanthes*, entretanto, ainda não há listas de descritores disponíveis. Alguns trabalhos envolvendo a caracterização morfológica de espécies do gênero, no Brasil, já foram desenvolvidos, principalmente na Universidade de São Paulo – Esalq, em Piracicaba-SP, sob a coordenação do Prof. Dr. Paulo Sodero Martins (Barros, 1978; Barriga, 1979; Battistin, 1981; Battistin & Martins, 1988); contudo, não foi possível a elaboração de listas de descritores para essas espécies, principalmente devido à falta de estabilidade dos caracteres avaliados.

Miles (1985), em Cali, Colômbia, estudou quatro marcadores morfológicos, potencialmente estáveis e que poderiam ser utilizados em estudos para se estimar a taxa de

polinização cruzada em *Stylosanthes guianensis*: cor da flor, cor do hipocótilo, cor da testa da semente e hábito de crescimento. Concluiu que apenas a cor das flores (amarela dominante sobre branca) poderia ser utilizada como marcador, as demais não apresentaram consistência em progênies F₂.

Com a popularização do uso de marcadores moleculares nos estudos de caracterização da variabilidade genética, a caracterização morfológica, principalmente para as espécies que ainda não dispõem de lista de descritores, tem sido preterida. Porém, ressalta-se que uma destas caracterizações não substitui a outra, haja vista as inconsistências observadas nos resultados das correlações entre os dois tipos de dados (Koehler-Santos et al., 2003; Netto et al., 2004; Oliveira, 2005; Costa, 2006; Zhang et al., 2007; Lattoo et al., 2008).

A avaliação agronômica preliminar é feita utilizando-se caracteres quantitativos, isto é, controlado por muitos genes e que são fortemente influenciados pelas condições ambientais. Neste caso, são tomados dados básicos sobre o potencial agronômico de cada acesso, como, por exemplo, diâmetro e altura da planta, ciclo, resistência a pragas e doenças (Valls, 1988; Nass, 2001; Hidalgo, 2003; Valls, 2007). O ideal, entretanto, seria que os dados desse tipo de avaliação estivessem disponíveis para todos os acessos; pois estes dados são primordiais para a definição dos acessos potenciais, a serem incorporados aos programas de melhoramento genético. Porém, estima-se que 90% de todos os acessos armazenados em bancos de germoplasma não possuem dados de avaliação preliminar (Peeters & Williams, 1984).

Após a avaliação agronômica preliminar, selecionam-se os acessos com maior potencial, que devem ser avaliados mais detalhadamente, em avaliações complementares. Os caracteres devem, então, ser escolhidos de acordo com o interesse de utilização da espécie (Valls, 1988; Hidalgo, 2003). Além disso, recomenda-se que essa avaliação seja feita nos mesmos locais onde se espera que os genótipos possam ser aproveitados, devido à influência ambiental sobre os caracteres. Nesse caso, também pode ser inserido nos procedimentos de avaliação, algum tipo de controle para se estimarem os efeitos ambientais sobre os caracteres (Valls, 1988; Nass, 2001; Hidalgo, 2003), uma vez que nesta fase se espera maior disponibilidade de sementes e menor número de acessos a serem avaliados.

Atualmente, há tendência de os curadores adotarem caracteres morfoagronômicos em suas avaliações (Karia et al., 1997; Nascimento Filho, 2001; Karia

et al., 2002; Okpul et al., 2004; Chiorato et al., 2005; Polignano et al., 2005; Costa et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Ortiz et al., 2008). Esses caracteres podem ser qualitativos ou quantitativos e incluem alguns atributos botânico-taxonômicos e outros que, não necessariamente, identificam os acessos da espécie, embora sejam importantes do ponto de vista das necessidades agronômicas, isto é, do melhoramento genético, do consumo e do mercado (Hidalgo, 2003). Alguns curadores incluem, ainda, descritores relacionados com os componentes de rendimento, com o objetivo de prover aos melhoristas alguma indicação sobre o potencial agronômico do acesso conservado.

Conforme discutido por Allem (2005), existe grande polêmica sobre a prática de se armazenar, a longo prazo, materiais não adaptados ou de baixo valor agronômico. Os defensores desta visão, chamada de utilitária, que considera os custos totais da conservação, acreditam que somente deveriam ser armazenados os acessos comprovadamente de valor agronômico, e não todos os acessos coletados, como defendem os chamados generalistas ou conservacionistas. Os primeiros ainda defendem que a caracterização deveria ser feita apenas para a identificação de duplicações e para auxiliar no estabelecimento de coleções nucleares. Outros, mais radicais, ainda preconizam que a caracterização teria menor importância do que a avaliação agronômica, de modo que somente os materiais aprovados agronomicamente deveriam ser submetidos à caracterização (Goodman, 1990).

Os generalistas ou conservacionistas, por sua vez, defendem que esse tipo de estratégia provocaria redução da variabilidade, pela seleção de acessos semelhantes às cultivares utilizadas, principalmente nas coleções de culturas tradicionais. Além disso, considerando-se as espécies silvestres, o grande processo de erosão genética causado pela ação antrópica nos centros de origem e de diversidade, levaria à perda de alelos importantes para o futuro da agricultura, que poderiam ser conservados *ex situ* nos bancos de germoplasma (Allem, 2005). Outro fator importante é a possibilidade de demandas futuras por mudanças no padrão agronômico de espécies cultivadas, em que a existência da variabilidade morfológica seria fundamental para o processo de melhoramento. O mesmo raciocínio vale para a introdução de espécies em outras regiões, não tradicionais, em que outros alelos poderiam conferir maior vantagem para o cultivo.

2.2.2 Caracterização morfoagronômica

Segundo Hidalgo (2003), as caracterizações morfológicas são diretamente influenciadas por três principais fatores limitantes, comuns na maioria dos bancos de germoplasma em todo o mundo, que devem ser considerados no planejamento das atividades. O primeiro fator é a limitação do material de propagação disponível, em quantidade e qualidade, que restringe o número de plantas, o número de repetições e a escolha de caracteres para a avaliação. Um segundo fator é a carência dos dados de passaporte dos acessos, que, muitas vezes, são coletados de forma oportunista, em razão do bom aspecto agrônomo da planta, sem que se tenha o cuidado de tomar os dados de forma adequada. Ainda sobre os dados de passaporte, muitas vezes é feita a introdução do germoplasma, sem os dados de passaporte, que ainda estão sendo organizados pelo coletor e, com o passar do tempo, esses dados podem não ser enviados. O terceiro fator é a baixa disponibilidade e qualidade da infra-estrutura, aliada à falta de recursos financeiros e humanos, disponíveis nas instituições.

Em geral, as plantas utilizadas para a avaliação são as mesmas que se utilizam para a multiplicação do germoplasma. Assim, para a condução dos ensaios de avaliação e caracterização, é preciso que se tenha profundo conhecimento sobre a biologia da espécie, especialmente em seus aspectos reprodutivos, pois isso vai determinar a maneira mais adequada para, por exemplo, se multiplicarem as sementes (Valls, 1988). Além disso, somente com o conhecimento sobre a espécie, o curador poderá colaborar na elaboração da lista de descritores ou dos caracteres agrônômicos a serem aplicados nas avaliações. Esse conhecimento, sobretudo para as espécies silvestres, também é importante na condução dos ensaios, para se evitarem perdas de acessos (Nass, 2001; Hidalgo, 2003; Valls, 2007).

A escolha dos caracteres a serem avaliados na caracterização morfoagronômica deve ser feita, de preferência, por uma equipe multidisciplinar, incluindo, necessariamente, o curador e o melhorista local (Nass, 2001). Neste caso, sempre se deve ter em mente a relevância e, ou, o poder do caráter em discriminar os acessos, a complexidade da sua mensuração de dados, o número de acessos a serem testados, a estrutura e os recursos disponíveis (Idris & Saad, 2001). Deve-se evitar, ainda, escolher caracteres muito correlacionados, pois estes serão pouco informativos e aumentarão o trabalho da pesquisa (Cruz et al., 2004)

Antes da instalação do campo experimental, recomenda-se o plantio de alguns poucos acessos para que se possa visualizar a variabilidade existente entre estes, nas características selecionadas (Idris & Saad, 2001). Esse teste também se presta para excluir e inserir caracteres, avaliar o nível de dificuldade na coleta dos dados, bem como verificar o nível de variabilidade dentro dos acessos, especialmente nas espécies silvestres, em que as amostras podem representar mistura de morfotipos. Caso se observe variação muito grande dentro dos acessos, recomenda-se, para a avaliação, a separação dos diferentes morfotipos, pois essa mistura pode prejudicar substancialmente a análise dos dados. Sempre é bom ressaltar que a conservação das sementes desses acessos deve ser feita tomando-se uma mistura das sementes dos morfotipos (Hidalgo, 2003).

Para se ter maior representatividade e confiabilidade nos dados, recomenda-se que a avaliação seja feita em três a cinco plantas por acesso e em duas ou mais repetições, se possível (Valls, 1988; Nass, 2001; Hidalgo, 2003). Caso não seja possível incluir repetições, é necessário que se escolha uma área bastante homogênea e que se faça rigorosa padronização na correção e adubação do solo. Uma prática bastante difundida, nesse tipo de avaliação, é a subdivisão da área em maior número possível de sub-áreas (talhões). Nesse caso, amostra-se o solo separadamente nestes talhões, fazendo-se, posteriormente, a recomendação e a aplicação de adubos e corretivos de forma específica para cada sub-área.

Com o objetivo de selecionar descritores morfoagronômicos para caracterizar acessos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), Alves (2002) testou 53 descritores, quatorze associados a características de folhas, dezoito à flor, dezesseis ao fruto e cinco descritores agrônômicos. Foram descartados 34 descritores considerados redundantes ou pouco informativos. Com os dezenove descritores restantes, foram caracterizados 31 acessos, concluindo-se que a coleção possuía ampla variabilidade fenotípica.

Netto et al. (2004) utilizaram caracteres morfoagronômicos, quantitativos e qualitativos, para avaliar uma coleção núcleo de milho, do tipo endosperma duro, contendo 58 acessos. Dez plantas de cada acesso foram utilizadas para a coleta de dados em 32 caracteres, entre eles, floração masculina e feminina, ramificação do pendão, altura da planta, diâmetro da espiga, tipo de espiga, cor do endosperma, forma da primeira folha, altura de inserção da espiga, peso da espiga e peso de mil sementes. Destes, os três últimos foram identificados como os caracteres de maior importância para discriminar os acessos da coleção.

Karia et al. (2002), em Planaltina-DF, avaliaram uma coleção de 62 acessos de *S. guianensis*, medindo-se doze caracteres morfoagronômicos, em cinco plantas por acesso, sem repetição dos acessos. Os caracteres avaliados foram: altura da planta; diâmetro da planta; comprimento da haste principal; número de ramos primários até à altura de 10 cm do solo; comprimento do primeiro ramo primário; comprimento e largura do folíolo central; comprimento e largura do folíolo lateral; número de dias para o início do florescimento e para o florescimento pleno; e susceptibilidade à antracnose. Os caracteres diâmetro da planta, comprimento dos folíolos, comprimento de ramos, comprimento da haste principal e susceptibilidade à antracnose foram identificados como os descritores de maior importância para a discriminação dos acessos da coleção. A avaliação para susceptibilidade à antracnose interferiu na condução do banco de germoplasma, uma vez que o controle químico foi suspenso e os acessos mais susceptíveis acabaram se perdendo. Dez acessos morreram em um primeiro momento e, posteriormente, mais alguns acessos foram perdidos, mesmo com a volta do controle químico da doença. Portanto, para esse tipo de avaliação, recomenda-se instalar ensaios específicos e não fazê-la simultaneamente nos campos de caracterização e multiplicação das sementes.

Posteriormente, Lazarotto-Formagini et al. (2006), em Campo Grande-MS, avaliaram onze acessos de *S. capitata* e utilizaram doze caracteres morfoagronômicos, tomados em dez indivíduos por acesso, também sem repetição. Os caracteres utilizados foram: diâmetro da planta, altura da planta, diâmetro do caule, comprimento da haste principal, comprimento da primeira ramificação, comprimento e largura do folíolo central, comprimento e largura do folíolo lateral, número de ramos primários até a altura de 10 cm do solo, formato da folha e número de nervuras na folha. O diâmetro da planta, a largura do folíolo central e o número de ramos até 10 cm do solo foram os descritores de maior importância na discriminação dos acessos avaliados.

2.2.3 Caracterização genético-molecular

A utilização de marcadores moleculares tem se tornado viável pela evolução de novas técnicas, redução dos custos de equipamentos e reagentes, e pela rapidez na obtenção de resultados. Por apresentarem as características de estabilidade e neutralidade, é uma ferramenta bastante interessante para estudos de diversidade genética e para a conservação de germoplasma (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Souza, 2001; Ferreira, 2007).

O surgimento da técnica de reação de polimerase em cadeia, conhecida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), na década de 1980, desenvolvida por Mullis & Faloona (1987), permitiu a síntese enzimática de milhões de cópias de um seguimento específico de DNA, tendo provocado uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular. Assim, surgiram várias ferramentas moleculares baseadas nessa técnica e, entre elas, as mais utilizadas atualmente são o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD*), o polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP*) e os marcadores microssatélites ou seqüências simples repetidas (*Simple Sequence Repeats – SSR*).

A técnica de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um seguimento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. Baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples), utilizados como iniciadores (*primers*), que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Esses *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo. Vários ciclos de desnaturação, anelamento e extensão são realizados e, assim, obtém-se DNA de seguimentos específicos do genoma, em grande quantidade, que podem ser facilmente detectados em gel de eletroforese (Mullis & Faloona, 1987). Para a construção dos *primers*, entretanto, é necessário o conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de interesse, assim, é preciso clonagem e seqüenciamento da região (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Marcadores RAPD são gerados pela amplificação de seguimentos de DNA, utilizando-se a idéia original da técnica de PCR, utilizando-se, porém, *primers* mais curtos e de seqüência repetitiva arbitrária, para dirigir a reação de amplificação. Elimina, assim, a necessidade do conhecimento prévio das seqüências específicas de nucleotídeos que flanqueiam as regiões alvo. Além dessa vantagem, o marcador RAPD necessita de pequenas quantidades de DNA, é aplicável a qualquer espécie, é simples, rápido e de custo relativamente baixo. Suas principais limitações são: baixo conteúdo de informação por loco, pois apenas um alelo é detectado, isto é, são marcadores dominantes, em que o seguimento é amplificado e as demais variações alélicas são desclassificadas conjuntamente como alelo nulo; a competição por substrato e enzimas, entre os diferentes sítios de amplificação, faz com que a presença de certos seguimentos interfira na

amplificação de outros seguimentos; e problemas relacionados à padronização das condições de amplificação ou mesmo mudanças de aparelhos podem alterar os resultados obtidos. Portanto, dados de marcadores RAPD não são considerados muito robustos e devem ser utilizados com muita cautela em análises filogenéticas, *fingerprint* e na determinação de paternidade (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Souza, 2001).

Na análise da diversidade genética entre acessos nos bancos de germoplasma, os marcadores RAPD são ainda amplamente utilizados, devido ao baixo custo da técnica e ao grande número de acessos para serem analisados. Yee et al. (1999) caracterizaram 58 acessos de *Vigna angularis*; Beebe et al. (2000) caracterizaram 269 raças locais americanas de feijão (*Phaseolus vulgaris*); Pengelly & Liu (2001) avaliaram 284 acessos da leguminosa americana *Desmanthus* spp.; Li & Nelson (2002) avaliaram a diversidade genética de quarenta acessos, entre raças locais e variedades primitivas de *Glycine max*, e em outros quarenta acessos de *Glycine soja*, coletados em quatro províncias da China; entre outros. Em todos esses trabalhos a técnica foi eficiente em revelar polimorfismo entre os acessos avaliados.

Em estudos com *Stylosanthes*, poucos trabalhos de utilização de marcadores RAPD são encontrados na literatura internacional. A maioria tem como objetivo o estudo de relações filogenéticas entre espécies ou investigações relacionadas (Karzan et al., 1992a; Karzan et al., 1992b, Karzan et al., 1993; Gillies & Abbott, 1994; Vieira et al., 1997).

No Brasil, os primeiros trabalhos de caracterização de coleções de *Stylosanthes* foram realizados na Embrapa Cerrados, por Faleiro et al. (2003). Os autores avaliaram a diversidade genética, utilizando marcadores RAPD, de uma amostra nuclear composta de 35 acessos de *S. guianensis*, estabelecida com base em caracteres morfoagronômicos. A análise evidenciou alta variabilidade genética da amostra e uma tendência de agrupamento de acessos pertencentes às mesmas variedades botânicas. Ainda com marcadores RAPD, há o trabalho desenvolvido por Barros et al. (2005), também na Embrapa Cerrados. Nesse estudo, foram caracterizados 87 acessos de *S. macrocephala*, com base em 161 marcadores, e os resultados de diversidade genética foram correlacionados com a variabilidade ecológica dos locais de coleta, utilizando-se um sistema de informações geográficas (SIG). Os resultados sugeriram ligação entre a diversidade genética observada e a adaptação ecológica dos acessos.

Dos três marcadores moleculares citados, baseados em PCR, o AFLP é o mais recente. Este marcador combina a especificidade, resolução e poder de amostragem das técnicas que utilizam enzimas de restrição, como o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP), com a velocidade e praticidade de detecção do polimorfismo por PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1996). A técnica consiste em digerir o DNA genômico com enzimas de restrição e, às extremidades dos fragmentos produzidos, liga-se um adaptador dupla fita, ou seja, um pequeno segmento de DNA constituído por uma seqüência específica, complementar a um *primer* para PCR. Dessa forma, após a ligação do adaptador, todos os fragmentos obtidos na digestão possuirão exatamente as mesmas seqüências de bases em sua extremidade, que são complementares a um *primer*. A amplificação deles será altamente específica, contrariamente ao que ocorre em RAPD (Souza, 2001).

A clivagem do DNA genômico é realizada, primeiramente, com uma enzima de corte raro e, posteriormente, com uma de corte freqüente, uma de cada vez. Assim, são geradas três classes de fragmentos: grandes, resultantes da clivagem pela primeira enzima (de corte raro) nas duas extremidades do DNA; pequenos, resultantes da clivagem pela segunda enzima (de corte freqüente) em ambas as extremidades; e intermediários, resultantes da combinação das clivagens rara e freqüente (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Ferreira, 2007). Nesse caso, o número de fragmentos gerados na digestão de um genoma é muito grande, o que torna bastante complexa a avaliação do polimorfismo. É necessário, portanto, efetuar-se a seleção de um subconjunto de fragmentos a serem amplificados. Essa seleção é feita em duas fases, a primeira, denominada amplificação pré-seletiva, utiliza um *primer* com a adição de um nucleotídeo seletivo em sua extremidade 3', que pode conter uma das quatro bases. Assim, na amplificação por PCR, em condições de anelamento específico, ocorrerá a amplificação apenas dos fragmentos que possuem tal nucleotídeo adjacente ao sítio de restrição, ou seja, um em cada dezesseis fragmentos. A segunda fase corresponde à amplificação seletiva, em que uma nova PCR é realizada, utilizando-se um oligonucleotídeo constituído pela seqüência do adaptador adicionada de três nucleotídeos aleatórios na posição 3'; o primeiro deles, necessariamente, deverá ser igual ao utilizado na pré-amplificação. Assim, amplifica-se um fragmento de cada 4.096 existentes (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Souza, 2001).

De forma análoga aos marcadores RAPD, a principal limitação desse tipo de marcador é o baixo conteúdo por loco, pois somente um alelo é amplificado e as demais

variações alélicas são classificadas, conjuntamente, como alelo nulo. São, portanto, marcadores dominantes, em que os genótipos heterozigotos não podem ser diferenciados dos homozigotos. Outras limitações da técnica são as maiores quantidades de etapas, de reagentes e de equipamentos necessários, e o DNA utilizado na digestão deve ser mais purificado do que o utilizado nas técnicas que envolvem apenas a PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Souza, 2001).

Jiang et al. (2005) avaliaram 42 acessos de *S. guianensis*, oriundos do CIAT e de dois Institutos de Pesquisa da China, utilizando-se marcadores AFLP, com o objetivo de mensurar a variabilidade genética da coleção e sua variabilidade quanto à tolerância à antracnose. Os marcadores foram gerados combinando-se quatro *primers* seletivos, o que produziu 215 bandas polimórficas. Verificou-se que o polimorfismo e a diversidade genética entre os acessos avaliados foram altos. Foi, ainda, possível identificar acessos tolerantes à antracnose, como, por exemplo, CIAT 2950 (cultivar Mineirão); porém, não se identificaram marcadores AFLP correlacionados com a tolerância ao patógeno.

Outra técnica molecular que pode ser empregada para a caracterização de germoplasma são os marcadores de locos microssatélites ou SSR. Microssatélites são seqüências curtas de DNA, de um a seis pares de bases, repetidas várias vezes no genoma, de maneira idêntica e adjacente, ou seja, com repetição em tandem. Em eucariotos, essas seqüências são freqüentes e bem distribuídas no genoma; ademais, as seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são bastante conservadas. Isso permite a seleção de um par de pequenos oligonucleotídeos iniciadores da fita réplica, *primers*, que possuem de vinte a trinta pares de bases, os quais permitem a amplificação da região alvo via PCR (Morgante & Olivieri, 1993). O polimorfismo é baseado nas diferenças de comprimento das seqüências amplificadas, pois o número de repetições em cada microssatélite é altamente variável. Os microssatélites são co-dominantes, ou seja, ambos os alelos do loco, de um indivíduo heterozigoto diplóide, são visualizados, sendo, ainda, multialélicos e bastante estáveis (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Ferreira, 2007).

Apesar das vantagens desse tipo de marcador, atualmente, o seu uso ainda é restrito. Isso porque o desenvolvimento dos oligonucleotídeos iniciadores ainda é um processo trabalhoso, caro e que requer pessoal especializado e equipamentos sofisticados.

Vander Stappen et al. (1999a) publicaram dezoito seqüências de *primers* microssatélites, específicos para *S. guianensis*. Esses oligonucleotídeos geraram polimorfismo nos 65 acessos do complexo *S. guianensis* avaliados, com média de 3,7

alelos por loco. Onze marcadores demonstraram conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) acima de 0,45. Segundo os autores, este é um valor considerado muito bom para a genotipagem de acessos em bancos de germoplasma.

Robles et al. (2006) testaram os dezoito pares de *primers* SSR desenvolvidos por Vander Stappen et al. (1999a), em vinte acessos de *S. guianensis*. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 3%, identificando-se 27 alelos. Os resultados, porém, revelaram polimorfismo em apenas quatro locos, e as distâncias genéticas entre os acessos variaram de 0,00 a 0,28. Estes resultados contrastam com os obtidos por Vander Stappen et al. (1999a), em que as distâncias entre acessos variaram de 0,10 a 0,70; embora deva-se considerar o fato de estes autores terem trabalhado com acessos do chamado complexo *S. guianensis*, no qual estão contidas outras sete espécies além de *S. guianensis* (Costa, 2006).

Outros resultados ainda podem ser reportados: Jiang et al. (2005), utilizando AFLP, em *S. guianensis*, encontraram distâncias genéticas variando de 0,05 a 0,69; Karzan et al. (1992b), com RAPD, encontraram valores entre 0,00 e 0,45, também para o complexo *S. guianensis*; e Faleiro et al. (2003), avaliando 35 acessos de *S. guianensis*, encontraram valores entre 0,04 e 0,54, com marcadores RAPD. Comparações entre os valores obtidos nesses trabalhos, entretanto, devem ser consideradas com ressalvas, pois em cada pesquisa avaliaram-se genótipos diferentes.

O uso de marcadores moleculares em estudos da diversidade genética em bancos de germoplasma pode ser bastante útil para se detectar redundâncias e deficiências das coleções, gerar informações sobre a eficiência dos processos de coleta, manutenção, manejo e intercâmbio dos acessos, além de auxiliar os melhoristas na escolha de genitores a serem utilizados em programas de melhoramento genético (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Ferreira et al., 2007). Assim, espera-se conseguir maior eficiência e eficácia nas atividades relacionadas com a conservação e uso do germoplasma, incluindo-se a possibilidade do estabelecimento de coleções nucleares, a partir dos dados gerados por marcadores moleculares (Brown, 1989a; Brown, 1989b).

Nesse sentido, alguns dos principais avanços incorporados nos últimos anos foram: o uso de marcadores fluorescentes; os métodos de genotipagem semi-automatizados, utilizando eletroforese em capilar; e os programas de computador específicos para as análises dos picos de fluorescência. Essas técnicas permitiram maior acurácia na determinação do tamanho do fragmento de DNA; maior facilidade para o estabelecimento de sistemas *multiplex*, que aumentam a capacidade de genotipagem por

reação; menor utilização de mão-de-obra para a genotipagem; e a eliminação da etapa de preparação de géis. Com isso, houve também aumento da eficiência em pesquisas envolvendo mapeamento genético, análise da diversidade genética, análise de pedigree e de *fingerprint* (Corbun et al., 2002).

Um dos principais problemas para a caracterização de coleções com muitos acessos é o de captar a variabilidade dentro das amostras. Para se avaliar 2.232 acessos da coleção de alface (*Lactuca* spp.) do Centro de Recursos Genéticos da Holanda (CGN), utilizando-se marcadores AFLP, foram analisadas 8.020 amostras, tendo sido necessário o estabelecimento de parcerias entre seis grandes institutos de pesquisas da Europa (van Hintun, 2003). A aplicação das técnicas de marcadores fluorescentes e de eletroforese, em capilar, tornou possível a estimação das frequências alélicas de mistura de DNA (DNA *pooled* ou DNA *bulking*) de plantas de um mesmo acesso. Esse procedimento permitiu a redução dos custos, do tempo e da mão-de-obra no trabalho de caracterização (Fu, 2003; Skalsk et al., 2006).

Checa et al. (2000) testaram a eficiência dessa técnica para a determinação das frequências alélicas, em amostras de DNA de sangue de bovinos. As amostras consistiam em misturas de DNA de diferentes animais, variando de três a cinquenta indivíduos. Foram utilizados dois *primers* microssatélites, marcados com fluorescência, e a eletroforese, em capilar, foi feita no seqüenciador automático ABI 310, da Applied Biosystems. Verificou-se que a correlação entre as estimativas das frequências em *pool* de DNA e as frequências verdadeiras foi alta, com R^2 acima de 0,86. Observou-se, também, que a precisão da estimativa é melhor para alelos cuja frequência dentro do *pool* é menor. Os autores concluíram que o método se justifica, sobretudo para estudos iniciais que envolvem grande número de amostras, como na identificação de regiões candidatas para se buscar genes associados a caracteres produtivos ou de resistência a doenças.

Em bancos de germoplasma a técnica pode ser utilizada, porém, considerando-se a possibilidade de algum tipo de vício nas estimativas das frequências alélicas, decorrente do número de plantas utilizadas no *bulk*, da frequência do alelo e do método de obtenção da mistura de DNA para a formação da amostra. Assim, os resultados devem ser utilizados com cautela para a identificação de acessos (*fingerprint*), entretanto, pode ser ótima alternativa para a avaliação exploratória das estimativas da diversidade genética de grandes coleções de germoplasma (Fu, 2003).

2.2.4 Estatística multivariada para dados de bancos de germoplasma

Os dados obtidos pela caracterização de acessos em bancos de germoplasma podem ser investigados segundo diferentes enfoques, entre os quais, os mais comuns são: a análise da diversidade genética, o estudo da divergência genética e a classificação dos acessos da coleção (Moreira et al., 1994).

As metodologias adotadas para os estudos das coleções de germoplasma, podem basear-se em estatísticas uni ou multivariadas, entretanto, dado que são mensurados vários caracteres, o mais comum é que a análise seja feita considerando-se todas as variáveis em conjunto, utilizando-se a abordagem multivariada. Os métodos mais utilizados são as análises por componentes principais e de variáveis canônicas, análise fatorial de correspondência, e os métodos de agrupamento (Moreira et al., 1994; Cruz et al., 2004).

2.2.4.1 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (ACP) é um procedimento que permite a visualização da estrutura das variáveis de uma matriz de dados, ou seja: identificação das variáveis que estão mais associadas entre si ou não; visualização da distribuição dos indivíduos e identificação dos acessos mais semelhantes e mais divergentes uns dos outros; e, por fim, identificação das variáveis que mais contribuem para a diferenciação dos acessos (Philippeau, 1986). Na área de recursos genéticos vegetais, a ACP tem sido empregada para estimar a variabilidade total disponível em um grupo de genótipos, identificar genitores divergentes para hibridação, estabelecer relação entre diversidade genética e geográfica, avaliar a uniformidade em cultivos, verificar a importância relativa dos caracteres em avaliações da divergência genética, e para se diminuir o número de descritores utilizados na caracterização e avaliação das coleções de germoplasma (Dias, 1994; Alves, 2002; Chiorato et al., 2005).

A ACP é um método estatístico essencialmente descritivo, aplicado a uma matriz de dados quantitativos multivariados. A idéia central da análise é a de reduzir a dimensão multidimensional de um conjunto de dados, contendo muitas variáveis inter-relacionadas, mediante a sua substituição por um novo conjunto de variáveis, não

correlacionadas entre si, denominadas componentes principais, mantendo-se, o quanto possível, a variação presente no conjunto de dados original (Jolliffe, 2004).

De forma bastante simplificada, pode-se dizer que componentes principais são índices sintéticos, obtidos como combinações lineares das variáveis originais. Entre todos os índices possíveis, a ACP pesquisa aqueles que permitem a melhor visualização dos indivíduos, os chamados componentes principais. Assim, uma sucessão de índices são identificados, em igual número ao de variáveis originais, de modo que o primeiro deles seja aquele para o qual a variância dos indivíduos é máxima; o segundo maximiza a variância remanescente do primeiro; e assim sucessivamente. Enfim, a busca dos sucessivos componentes principais é feita sob duas condições: *i*) haver correlação linear nula entre eles; e *ii*) cada novo componente maximiza a variância remanescente do componente anterior. E, as proporções da variação total dos indivíduos explicada pelos sucessivos componentes correspondem aos autovalores da matriz de covariância dos dados, dispostos em ordem decrescente (Philippeau, 1986; Jolliffe, 2004).

Para a obtenção dos componentes principais é preciso, portanto, decompor a matriz de covariâncias e determinar os seus autovalores e correspondentes autovetores. Como essa decomposição parte da matriz de covariâncias, é visível que a ordem de grandeza das variáveis originais influencia o resultado da ACP (Philippeau, 1986). Para se evitar esse inconveniente é recomendável padronizar as variáveis, pelas respectivas médias e desvios padrão, gerando-se novas variáveis centradas em zero e com variâncias iguais a um. Nesse caso, a ACP aplicada aos dados padronizados ou estandardizados é equivalente à obtenção dos componentes principais a partir da matriz de correlações das variáveis originais (Mingoti, 2007). As implicações de se utilizar ou não a matriz de correlações na determinação dos componentes principais e sua influência na interpretação dos resultados são discutidos por Jolliffe (2004). Segundo o autor, a principal vantagem de se utilizar a matriz de covariâncias é que as inferências estatísticas sobre os componentes são mais claras e, portanto, de interpretação mais fácil. Como na prática a ACP é mais utilizada como ferramenta descritiva do que inferencial, recomenda-se, na maioria dos casos, a padronização dos dados. É importante ressaltar, ainda, que os coeficientes dos componentes principais, obtidos por meio da decomposição da matriz de correlações, não são iguais aos coeficientes obtidos através da decomposição da matriz de covariâncias. Em geral, em termos de explicação da variância total, quando se utiliza a primeira matriz,

necessita-se de maior número de componentes principais para explicar a mesma proporção desta variância (Mingoti, 2007).

Uma vez obtidos os componentes principais (eixos fatoriais), é possível, então, representar os indivíduos (ex. acessos de um banco de germoplasma) como uma nuvem de pontos, em um sistema de eixos ortogonais. Como a nossa capacidade de visualização se restringe a um espaço de três dimensões, a representação gráfica será de melhor qualidade, se a maior parte da variação total estiver representada pelos três primeiros componentes principais. A recomendação geral, para que se tenha uma boa visualização gráfica, sem grandes distorções, é a de que os dois ou três primeiros componentes devam representar pelo menos 80% da variação total (soma dos autovalores, em porcentagem); caso contrário, a análise deve ser complementada com dispersões gráficas tomadas em relação a componentes sucessivos (Cruz et al., 2004). Assim, a decisão sobre o número de componentes principais a serem retidos numa ACP torna-se importante. McGarigal et al. (2000) discutem vários métodos para essa tomada de decisão, entre estes, o uso de testes de significância por re-amostragem (*jackknife*, *bootstrap* e teste de randomização) e o emprego de critérios como *broken stick*, *latent root*, *scree-plot* e a representatividade em relação à variância total. Segundo os autores, os três últimos critérios são os métodos mais comuns.

O critério *latent root* é usado quando os componentes são determinados a partir da matriz de correlação. Por esse critério, os componentes com autovalores menores do que 1,0 são excluídos, pois acumulam menos variância do que uma simples variável original e, portanto, não podem ser interpretados individualmente. O critério do *scree-plot* consiste na construção de um gráfico com os valores numéricos dos autovalores e a ordem do componente. Assim, basta observar no gráfico o ponto em que os autovalores tendem a se estabilizar e, a partir desse ponto, excluem-se todos os componentes de maior ordem. O critério da representatividade em relação à variância total é, talvez, o mais utilizado. Os autovalores são transformados em porcentagem e, em geral, escolhe-se, arbitrariamente, um valor entre 70% e 80% de representatividade da variância total. O número de componentes principais retidos é aquele cujo somatório das porcentagens atinja o valor desejado.

Pela representação gráfica é possível observar se os indivíduos estão dispersos de forma homogênea ou se alguns indivíduos estão completamente fora da nuvem central de pontos, correspondente à maioria da população. Nesse último caso, é interessante, primeiramente, verificar se houve algum engano na coleta ou digitação de dados. Se

negativo, recomenda-se refazer a análise, utilizando-se esses indivíduos como suplementares, de modo a melhorar a dispersão dos demais indivíduos. Caso se observe a formação de grupos e o interesse da pesquisa for o de estudar as inter-relações entre as variáveis, é conveniente refazer a ACP para cada sub-grupo (Philippeau, 1986).

A análise do relacionamento entre as variáveis, por ACP, é feita utilizando-se os chamados círculos de correlações, que são representações gráficas dos vetores das variáveis, nos eixos ortogonais formados pelos componentes principais. A interpretação é feita observando-se as correlações dos vetores com os próprios componentes principais e, também, considerando-se as direções entre os vetores das variáveis. Para saber se uma variável está bem representada, deve-se somar o quadrado do coeficiente de correlação das variáveis com os componentes principais retidos. A interpretação deste coeficiente é análoga à do coeficiente de determinação em análise de regressão, considerando-se: valor de $\sum r^2 \geq 0,80$, como muito bem representada; $0,65 < \sum r^2 < 0,80$, bem representada; $0,40 < \sum r^2 < 0,65$, medianamente representada; e $\sum r^2 \leq 0,40$, mal representada (Philippeau, 1986).

A ACP também tem sido empregada como ferramenta para o descarte de variáveis que pouco contribuem para a diferenciação de acessos em coleções de germoplasma. A metodologia mais conhecida foi proposta por Jolliffe (1972, 1973), que avaliou, com dados simulados e com dados reais, vários métodos de descarte de variáveis: dois métodos baseados em correlação múltipla, dois baseados em análise de agrupamento e quatro utilizando-se a ACP. Com relação aos métodos baseados em ACP, concluiu que os resultados mais satisfatórios foram obtidos quando o número de variáveis descartadas (D) é dado por: $D = p - k$, sendo p , o número total de variáveis, e k , o número de componentes além daqueles que acumularam 70% da variância total. Mardia et al. (1979) complementaram esse método, propondo que as $p - k$ variáveis a serem descartadas são aquelas com os maiores coeficientes, em valor absoluto, nos respectivos autovetores de cada um dos últimos componentes principais (além daqueles que acumularam 70% da variância total).

Cury (1993), em trabalho sobre caracterização de trinta clones de mandioca, realizou o descarte de variáveis seguindo a proposta preconizada por Mardia et al. (1979), porém, propôs que, a cada descarte, fosse realizada nova análise com os caracteres remanescentes, obtendo-se, assim, novos autovalores e autovetores. A análise prosseguia até não ser mais possível discriminar os maiores coeficientes dos autovetores, ou pela

inconsistência de descartar caracteres não redundantes. Após cada análise, era observada a matriz de correlações fenotípicas para auxiliar nesse descarte.

Outras técnicas de análise multivariada, consideradas variações da ACP, são a análise de correspondência e a análise de variáveis canônicas. A primeira é adequada para dados discretos, provenientes de variáveis categóricas, sendo a análise feita a partir de uma tabela de contingência (Jolliffe, 2004; Silva, 2008). A segunda, como na ACP, é também utilizada para dados quantitativos, porém, necessita-se, além da matriz de covariâncias fenotípicas, a matriz de covariâncias residuais. Portanto, para se utilizar a análise de variáveis canônicas é necessário um delineamento experimental, com repetições, adequado para se estimarem os resíduos, o que é raro em caracterizações de bancos de germoplasma com muitos acessos (Cruz et al., 2004).

2.2.4.2 Análise de coordenadas principais

A análise de coordenadas principais (PCO ou PCoorda) é também considerada como uma variação da análise de componentes principais e, atualmente, tem sido bastante empregada na análise de dados gerados a partir de caracterizações moleculares. Assim como a ACP, essa análise é um método de ordenação, também conhecido como *classical scaling*. Foi popularizada por Gower (1966), embora Torgerson (1958) já tivesse discutido idéias similares, sem, entretanto, fazer a ligação com a ACP. Segundo Gower (1967), a técnica de PCO é, em última análise, mais abrangente que a ACP, pois pode ser aplicada a qualquer matriz de similaridade (ou dissimilaridade) de um conjunto de dados, desde que esta matriz seja simétrica e positiva semi-definida. Por isso, o método também pode ser empregado quando os dados são de natureza qualitativa, ao contrário da ACP, que requer dados quantitativos.

A técnica consiste em se produzir um gráfico de dispersão, num espaço de dimensão reduzida, cujos pontos representem, o mais aproximadamente possível, as distâncias entre os elementos (indivíduos) do conjunto de dados. O ponto de partida da análise é, portanto, uma matriz de (dis)similaridade entre as observações (indivíduos), enquanto na ACP utiliza-se a matriz de covariâncias ou de correlações entre as variáveis. Assim, a primeira (PCO) opera sobre uma matriz de dimensão $n \times n$, enquanto a segunda (ACP), sobre uma matriz $p \times p$, embora ambas produzam representações gráficas dos n elementos observados como uma nuvem de pontos (Jolliffe, 2004). Dessa forma, são

geradas diretamente as n coordenadas principais, em vez de p componentes principais, como na ACP.

Muitas vezes, os resultados dos dois tipos de análises (ACP e PCO), isto é, as representações gráficas dos elementos da matriz, podem ser exatamente iguais (Rolf, 2000; Jolliffe, 2004). Entretanto, embora equivalentes, existem diferenças fundamentais entre as duas análises. Na análise de coordenadas principais não há como estabelecer relações entre as variáveis, pois não são produzidos os vetores correspondentes às variáveis originais. Obviamente, não há também como estabelecer correlações entre as coordenadas principais e as variáveis e, conseqüentemente, não é possível, como na ACP, dar sentido prático às coordenadas principais. Logo, quando os dados tiverem natureza quantitativa e a análise das variáveis for importante para a interpretação dos resultados, a ACP deve ser preferida, em detrimento da análise de coordenadas principais (Jolliffe, 2004).

2.2.4.2 Medidas de similaridade e dissimilaridade

Uma importante questão na caracterização de acessos em bancos de germoplasma refere-se ao critério a ser utilizado para se decidir até que ponto dois acessos podem ser considerados como semelhantes ou não. Para respondê-la é necessário considerar medidas que descrevem a similaridade ou a dissimilaridade entre esses elementos amostrais, de acordo com as características que neles foram medidas. Se considerarmos que, para cada acesso, têm-se informações de p variáveis, armazenadas em um vetor, a comparação poderá ser feita por meio de medidas matemáticas (métricas), que possibilitem a comparação dos vetores, como as medidas de distância (Mingoti, 2007).

As medidas de dissimilaridade mais utilizadas para dados quantitativos são a distância euclidiana, a distância euclidiana média, a distância generalizada de Mahalanobis e a distância de Minkowski.

A distância euclidiana é dada por:

$$d_{ii'} = \sqrt{\sum_j (x_{ij} - x_{i'j})^2},$$

em que: x_{ij} e $x_{i'j}$ são as médias dos indivíduos i e i' para a variável j ($j = 1, 2, \dots, p$).

A distância euclidiana apresenta como inconveniente o fato de ser alterada com a mudança da escala de medições, com o número de caracteres estudados e de não levar em consideração o grau de correlação entre os caracteres (Cruz et al., 2004). Para

contornar o problema da escala, recomenda-se a padronização dos dados, e para a influência do número de caracteres, a alternativa é utilizar-se da chamada distância euclidiana média, que é dada por:

$$d_{ii'} = \sqrt{\frac{1}{p} \sum_j (x_{ij} - x_{i'j})^2},$$

em que: p é o número de variáveis..

Mesmo assim, a medida pode ser ainda distorcida pela correlação entre as variáveis, tornando os eixos dos gráficos de dispersão oblíquos e não perpendiculares. Para solucionar esse problema, a melhor alternativa para dados quantitativos é a distância generalizada de Mahalanobis (D^2), que leva em consideração a correlação entre os caracteres e pode ser estimada a partir das médias dos dados originais e da matriz de covariâncias residuais:

$$D_{ii'}^2 = (x_i - x_{i'})' V^{-1} (x_i - x_{i'}),$$

em que: V é a matriz de covariâncias residuais; e x_i e $x_{i'}$ são os vetores de médias para os indivíduos i e i' , respectivamente.

Outra forma de se estimar a distância de Mahalanobis é calculando-se a distância euclidiana, a partir das variáveis normalizadas e ortogonalizadas:

$$D_{ii'}^2 = \sum_j (z_{ij} - z_{i'j})^2,$$

em que: $z_{ij} = \frac{1}{r} \sum_k z_{ijk}$, sendo z_{ijk} o i -ésimo indivíduo, em relação à j -ésima variável, na k -ésima repetição, e r é o número de repetições.

Observa-se, portanto, que a utilização da distância de Mahalanobis pode ser bastante útil nos casos em que há correlação entre os caracteres e esta medida equivale à distância euclidiana, quando essa correlação é nula. Entretanto, Cruz (2001) recomenda que, não havendo repetições, situação bastante comum nas avaliações de acessos em bancos de germoplasma, deve-se preferir a distância euclidiana.

Outra medida de dissimilaridade aplicada a dados de natureza quantitativa é a distância de Minkowski:

$$d_{ii'} = \left[\sum_j w_j |x_i - x_{i'}|^m \right]^{\frac{1}{m}},$$

em que: w_j é um fator de ponderação das variáveis; e m é um número inteiro que pode assumir valor 1 ou 2, isto é, $m = 1$ esta distância é conhecida como distância *city-block* ou de Manhattan; e para $m = 2$, tem-se a distância euclidiana. A métrica de Minkowski é

menos afetada pela presença de valores discrepantes na amostra do que a distância euclidiana (Johnson & Wichern, 1992; Mingoti, 2007), porém, esta é ainda pouco utilizada em trabalhos envolvendo recursos genéticos vegetais.

Em bancos de germoplasma também é comum a geração de dados binários (presença ou ausência), seja por alguma caracterização morfológica ou pela caracterização molecular via marcadores dominantes. Nesses casos, as medidas de similaridade ou dissimilaridades são baseadas em tabelas de contigência, em que se atribui o valor 1 para presença e 0 para ausência. Os indivíduos são comparados dois a dois, proporcionando várias formas de comparação. Os métodos mais comuns são a distância euclidiana média, o coeficiente de concordância simples (*simple matching*), o coeficiente de Dice e o coeficiente de Jaccard. Este último é o mais utilizado nas análises com marcadores moleculares dominantes, sendo definido como o número de pares realmente concordantes, do tipo 1 - 1, em relação ao número total de pares, excluindo-se os pares com ausência total, do tipo 0 - 0 (Mingoti, 2007).

Outro tipo de dado gerado nas avaliações de acessos em bancos de germoplasma refere-se às frequências alélicas, que podem ser estimadas, mais frequentemente nos dias atuais, pelo uso de marcadores moleculares de natureza co-dominante, do tipo RFLP e microssatélites (SSR).

Reif et al. (2005) avaliaram as propriedades de sete medidas de distância, comumente utilizadas em trabalhos com marcadores moleculares co-dominantes, em seus aspectos genéticos e matemáticos. Os autores fazem referência à adequação de cada um deles, levando-se em conta os objetivos da pesquisa. Para os objetivos mais comuns nos trabalhos com recursos genéticos em bancos de germoplasma, em que se propõe avaliar as diferenças entre os indivíduos ou acessos, os autores destacam as distâncias euclidiana e de Rogers.

Para dados de frequências alélicas, as distâncias euclidianas, original e média, respectivamente, são dadas por:

$$d_E = \sqrt{\sum_i \sum_j (p_{ij} - q_{ij})^2} \quad \text{ou} \quad d_E = \frac{1}{m} \sqrt{\sum_i \sum_j (p_{ij} - q_{ij})^2}$$

em que: p_{ij} e q_{ij} são as frequências alélicas do j -ésimo alelo no i -ésimo loco, e m é o número de locos examinados.

Os valores da distância euclidiana, neste caso, podem variar de zero a $(2m)^{1/2}$. Fica claro, portanto, que as comparações de distância entre diferentes experimentos ficam

comprometidas, a não ser que os experimentos tenham o mesmo número de marcadores. Essa medida é adequada para os trabalhos que avaliam a relação entre diferentes elementos amostrais (populações, acessos, indivíduos), combinada com métodos multivariados que requerem as propriedades das distâncias euclidianas (análise de coordenadas principais, classificação, classificação hierárquica e análise de agrupamento com métodos hierárquicos).

A distância de Rogers é uma modificação da distância euclidiana, que é dada por:

$$d_R = \frac{1}{m} \sum_i \sqrt{\frac{1}{2} \sum_j (p_{ij} - q_{ij})^2}.$$

Essa distância corresponde à ponderação da distância euclidiana média, por $(2)^{1/2}$, para que o intervalo de valores fique entre zero e um. É adequada para a validação de coleções nucleares e para a identificação de duplicatas em bancos de germoplasma. Outra opção é a distância de Rogers modificada por Wright (1978), que amplia a distância original para mais de um alelo, atribuindo para cada um, uma dimensão:

$$d_W = \frac{1}{\sqrt{2m}} \sqrt{\sum_i \sum_j (p_{ij} - q_{ij})^2}.$$

Observa-se que nas duas distâncias de Rogers, o seu valor somente será um se os dois indivíduos tiverem locos fixados por alelos diferentes. Caso não estejam fixados, a distância não será igual a um, mesmo que os indivíduos não tenham alelos em comum. Assim, além de servir para os mesmos propósitos das distâncias euclidianas, a distância de Rogers modificada por Wright (1978) é adequada para estudos envolvendo a predição de heterose em cruzamentos e o estabelecimento de grupos heteróticos.

2.2.4.4 Análises de agrupamento

A análise de agrupamentos, também conhecida com análise de conglomerados, tipologias ou de classificação (*cluster analysis*), tem como objetivo dividir os elementos da amostra ou população, em grupos, de forma que os elementos pertencentes a um mesmo grupo sejam similares entre si, em relação às características avaliadas, e os elementos de grupos diferentes, heterogêneos em relação a estas mesmas características (Mingoti, 2007). O processo de agrupamento envolve duas etapas básicas: a estimativa de uma medida de

dissimilaridade ou de similaridade entre os indivíduos ou acessos, e a adoção de uma técnica de agrupamento para a formação dos grupos (Cruz et al., 2004).

As distâncias entre os acessos, objeto de revisão na seção anterior (2.2.4.3), podem ser tomadas em relação aos componentes principais, tendo, neste caso, a vantagem de reduzir um grande número de variáveis originais, geralmente correlacionadas, substituindo-as por um pequeno número de componentes principais, não correlacionados. Entretanto, vale ressaltar que, na maioria das vezes, os resultados dos agrupamentos obtidos são diferentes, de modo, que esse procedimento deve ser usado com bastante cautela (Mainly, 1986).

Há um elevado número de métodos de agrupamento e esses métodos são classificados de acordo com os critérios adotados para a formação dos grupos. Eles são divididos em dois grupos principais: os hierárquicos e os não hierárquicos (ou de otimização).

As técnicas de agrupamento não hierárquicas têm como objetivo encontrar diretamente uma partição de n elementos em k grupos, de modo que a partição satisfaça os requisitos de coesão interna (dentro dos grupos) e isolamento dos grupos formados. Para se buscar a melhor partição de ordem k , é necessário utilizar um critério que meça a qualidade dos requisitos anteriores. Como, geralmente, é inexecutável a criação de todas as partições possíveis de ordem k e decidir qual delas é a mais adequada, são utilizados processos que investigam algumas das partições, com o objetivo de se encontrar uma que seja 'quase ótima'. Nos métodos não hierárquicos o número de grupos deve ser previamente definido e em cada estágio do agrupamento, novos grupos podem ser formados por meio da divisão ou junção dos grupos já formados em passos anteriores e, como consequência, não é possível a construção de dendrogramas (Mingoti, 2007). Em geral, os algoritmos utilizados nesse tipo de método são iterativos e possuem maior capacidade para analisar conjuntos de dados de maior tamanho (Johnson & Wichern, 1992; Mingoti, 2007). Entre as técnicas mais populares nesta classe estão o método de Tocher e o das k -médias.

Os métodos hierárquicos são os mais usados e se caracterizam por manter uma hierarquia entre as sucessivas configurações de agrupamentos. Essa classe de métodos, por sua vez, divide-se em duas subclasses: os métodos divisivos e os aglomerativos. Os métodos divisivos partem do princípio de que os n elementos formam um grande e único grupo; procuram, então, separar em dois grupos mais homogêneos internamente e que mais diferem entre si; em seguida, cada grupo é dividido novamente, observando-se os mesmos

critérios anteriores e, assim, sucessivamente, até a formação de n grupos, com um elemento em cada grupo. Os métodos hierárquicos aglomerativos, inversamente, partem do princípio de que existem n grupos, cada um com um elemento; procuram, então, pelos dois grupos mais semelhantes, os quais são unidos para formar um novo grupo, obtendo-se, assim, a melhor configuração com $(n - 1)$ grupos; o processo continua, sempre pela união dos dois grupos mais similares, até a formação de um único grupo, com n elementos (Milligan & Cooper, 1987).

Os métodos hierárquicos aglomerativos são os mais conhecidos e utilizados. Dificilmente um programa estatístico que executa análises de agrupamento não conterá, pelo menos, um método desse tipo. O programa SAS (*Statistical Analysis System*), em seu procedimento *Cluster* (Proc Cluster), possui onze opções diferentes de métodos hierárquicos aglomerativos (SAS Institute Inc., 2008). A seguir, são apresentados alguns dos métodos desta classe, que são mais utilizados em trabalhos com recursos genéticos.

No método do vizinho mais próximo ou de ligação simples (*single linkage method* – SLM), a distância entre dois conglomerados é definida pelos dois elementos mais próximos entre si, conforme a seguinte expressão (SAS Institute Inc., 2008):

$$D_{KL} = \min_{i \in C_K} \min_{j \in C_L} d(x_i, x_j)$$

D_{KL} : distância ou dissimilaridade entre os grupos C_K e C_L ;

$d(x_i, x_j)$: distância entre as observações x_i e x_j , correspondentes aos indivíduos i , pertencente ao grupo C_K , e j , pertencente ao grupo C_L .

Esse método possui muitas propriedades desejáveis do ponto de vista teórico, entretanto, em artigo de revisão publicado por Milligan & Cooper (1987), os autores demonstraram que, entre os métodos hierárquicos aglomerativos, este foi o pior deles, considerando-se onze trabalhos que avaliaram e compararam métodos de agrupamento. O método tem a habilidade de detectar grupos irregulares e elipsoidais, porém, sua capacidade de detectar grupos compactos é sacrificada (SAS Institute Inc., 2008).

Apesar disso, ainda é um método bastante popular entre os pesquisadores da área agrônômica. Em Planaltina-DF, foram avaliadas coleções de acessos de *S. guianensis*, *S. scabra* e *S. capitata*, em que os dados de cada espécie foram analisados separadamente. O método do vizinho mais próximo foi aplicado, resultando em grupos de acessos com características semelhantes, permitindo, assim, identificar aqueles com maiores potenciais agrônômicos (Karia et al., 2002).

O método do vizinho mais distante, também chamado de método de ligação completa (*complete linkage method* – CLM), utiliza a lógica inversa à do método anterior. A distância ou dissimilaridade entre dois conglomerados é determinada pelos elementos que são menos semelhantes entre si. Utilizando-se a mesma notação da fórmula anterior, a distância entre dois grupos é definida por:

$$D_{kl} = \max_{i \in C_K} \max_{j \in C_L} d(x_i, x_j)$$

Esse método é fortemente tendencioso em produzir grupos com igual diâmetro e, também, na presença de medidas discrepantes, os resultados podem ser bastante distorcidos (SAS Institute Inc., 2008).

O método da média das distâncias (*average linkage*) pode ser usado com ponderação (*weighted pair group method with arithmetical average* – WPGMA) ou sem ponderação (*unweighted pair group method with arithmetical average* – UPGMA). Entre estes, o mais empregado, sobretudo em genética molecular, é o UPGMA, que trata a distância entre dois conglomerados como a média das distâncias entre todos os pares de elementos que podem ser formados com os dois grupos sob comparação (Mingoti, 2007). Assim, a expressão da distância entre grupos é definida por:

$$D_{KL} = \frac{1}{N_K N_L} \sum_{i \in C_K} \sum_{j \in C_L} d(x_i, x_j)$$

em que: N_K e N_L são os números de observações nos grupos K e L , respectivamente.

Esse método tende a unir grupos com pequenas variâncias e é levemente tendencioso em produzir grupos com a mesma variância (SAS Institute Inc., 2008).

Existem ainda métodos alternativos como o do centróide, da mediana, da densidade, o método beta-flexível, dentre outros (SAS Institute Inc., 2008). Estes, porém, são pouco utilizados no melhoramento de plantas.

Dentre os métodos de agrupamento hierárquico aglomerativo, o método de Ward é o que mais tem ganhado adeptos na área de melhoramento de plantas. É bastante utilizado nas áreas de saúde e ciências sociais, mas, o seu uso na área agrônômica era relativamente restrito. Nos procedimentos anteriores, quando se passa de um estágio k para o estágio $k+1$, no algoritmo de agrupamento, a qualidade da partição decresce, pois com o aumento no nível de fusão, a variação entre grupos diminui e a variação dentro dos grupos aumenta. Baseado nessa observação, J. H. Ward, em 1963, propôs o seu método fundamentado nessa mudança de variação entre e dentro dos aglomerados, que ocorre a

cada passo de fusão dos grupos (Mingoti, 2007). Assim, é também conhecido como método de mínima variância de Ward (*Ward's minimum variance linkage*).

O método de Ward opera melhor sobre a matriz dos dados originais do que sobre a matriz de similaridade ou dissimilaridade, pois usa como medida de distância a soma de quadrados entre dois grupos, em relação a todas as variáveis:

$$D_{KL} = \frac{||\bar{\mathbf{x}}_K - \bar{\mathbf{x}}_L||^2}{\frac{1}{N_K} + \frac{1}{N_L}}$$

D_{KL} : distância ou dissimilaridade entre os grupos C_K e C_L ;

$\bar{\mathbf{x}}_K$ e $\bar{\mathbf{x}}_L$: vetores médios dos grupos C_K e C_L , respectivamente; e

N_K e N_L : número de observações nos grupos C_K e C_L , respectivamente.

Nesse método, a cada passo, a soma de quadrados dentro de grupos é minimizada em relação ao conjunto de todas as possíveis configurações obtidas pela junção de dois grupos. As somas de quadrados são facilmente interpretadas, pois quando são divididas pela soma de quadrados total, fornecem a proporção da variância em cada passo, também chamada de correlação semi-parcial ao quadrado (SAS Institute Inc., 2008). A estratégia utilizada é semelhante à adotada pelos métodos de otimização como o das k -médias e o de Tocher. Entretanto, pela natureza hierárquica do método de Ward, é possível a construção de dendrogramas, o que não ocorre com aqueles métodos (McGarigal et al., 2000). Quando a distribuição das p variáveis é normal multivariada, em cada passo do agrupamento, o método se assemelha ao de máxima verossimilhança. No entanto, vale ressaltar que a aplicação do método de Ward não requer que os dados sejam provenientes de uma população com distribuição normal multivariada. Para usá-lo, basta que as p variáveis sejam quantitativas e passíveis do cálculo de médias (Mingoti, 2007). Porém, de fato, o método terá melhor desempenho nos casos em que a distribuição for normal multivariada, com matrizes de covariâncias esféricas e iguais (SAS Institute Inc., 2008).

Esse método tende a formar grupos com pequeno número de elementos e, também, com o mesmo número de indivíduos por grupo. É também sensível à presença de elementos discrepantes. Mesmo assim, no estudo de Milligan & Cooper (1987), já reportado anteriormente, foi o que proporcionou o melhor desempenho entre os métodos hierárquicos aglomerativos estudados.

Mingoti (2007) cita, ainda, os métodos *fuzzy*, *c-means* e o de redes neurais, como alternativas para o estabelecimento de grupos em um conjunto de elementos. Porém

estes ainda são pouco utilizados devido à complexidade estatística e à necessidade de maior capacidade computacional. Nesses dois casos, a autora não classifica os métodos como hierárquicos ou não hierárquicos, mas sim, como métodos à parte.

Nos métodos hierárquicos, uma questão fundamental é sobre qual é o número de grupos mais adequado e que representa a provável estruturação natural do conjunto de elementos, em relação aos dados tomados. Nesse contexto, existem basicamente dois tipos de erros que podem ocorrer quando se toma a decisão de parar o algoritmo de agrupamento. O primeiro é quando o número de grupos formados é maior do que o verdadeiro (estruturação natural dos elementos), e o segundo, quando o número de grupos é menor do que o verdadeiro. Embora a severidade dos dois tipos de erros possa mudar, dependendo do contexto do problema, o segundo tipo de erro pode ser considerado como mais sério na maioria dos casos, devido à perda de informação pela fusão de grupos distintos (Milligan & Cooper, 1985).

Existem vários critérios disponíveis que auxiliam a tomada de decisão sobre quando se parar o algoritmo. Esses critérios podem variar de métodos baseados em pesadas teorias estatísticas e computacionais, até métodos bastante subjetivos, sujeitos à interpretação de cada pesquisador ou usuário.

Milligan & Cooper (1985), utilizando o algoritmo de Monte Carlo, testaram trinta critérios usados em técnicas hierárquicas de agrupamento. Foram empregados quatro conjuntos de dados artificiais, com cinquenta pontos cada, quatro métodos hierárquicos de agrupamento, três dimensões euclidianas, três diferentes distribuições de indivíduos dentro de cada grupo e três repetições, gerando-se 432 simulações por critério. Os trinta critérios foram selecionados por serem pouco dependentes da subjetividade, ou seja, o procedimento deveria fornecer uma regra automática de decisão. Entre os melhores métodos estiveram os propostos por Calinski & Harabasz, em 1974, conhecido como estatística Pseudo F (PSF) e o desenvolvido por Duda & Hart, em 1973, chamado de $Je(2)/Je(1)$ ou Pseudo T^2 (PST^2) (Crossa & Franco, 2004). Um terceiro método, chamado de CCC (*cubic clustering criterion*) (Sarle, 1983), também mereceu destaque. Este ficou em sexto lugar quando se considerou o número de acertos totais, embora seus erros, quando ocorriam, eram para aumentar o número de grupos, e a diferença entre o real e o encontrado, em geral, era de apenas um grupo.

Na estatística Pseudo F, a cada passo do algoritmo de agrupamento, é como se estivesse sendo feito um teste F de análise de variância, para a comparação dos vetores de

médias dos grupos que foram formados no respectivo passo. Busca-se, então, o maior valor de Pseudo-F, ou seja, aquele que estaria relacionado com a menor probabilidade de significância do teste e, assim, estaria rejeitando-se a igualdade de vetores de médias populacionais com maior significância (Mingoti, 2007). Quando se observa um aumento monotônico do valor de Pseudo F, com o aumento do número de grupos, os dados sugerem que não existe qualquer estrutura natural de partição dos dados. Se, no entanto, isso não ocorrer e a função F apresentar um valor máximo (pico), o número de conglomerados referente a esse valor corresponderá à partição ideal dos indivíduos (Crossa & Franco, 2004; Mingoti, 2007).

A idéia do critério Pseudo T^2 se assemelha à da estatística Pseudo F e está relacionada com o uso de um teste de hipótese. É como se, em cada passo do algoritmo de agrupamento, estivesse sendo feito um teste para a comparação dos vetores de médias dos dois grupos que se uniram para formar um novo grupo. Em cada passo, é calculado um valor da estatística Pseudo T^2 e, então, um gráfico do tipo passos *versus* Pseudo T^2 pode ser traçado. Busca-se o maior valor de Pseudo T^2 , ou seja, aquele que estaria relacionado com a menor probabilidade de significância do teste, rejeitando-se, portanto, a igualdade dos vetores de médias, com maior significância. Como resultado, se a igualdade entre os vetores de médias é rejeitada, os dois conglomerados não deveriam se unir para formar um único grupo (Mingoti, 2007). Para definir o número ideal de grupos, observa-se o gráfico, acompanhando-se o eixo do número de grupos, do maior valor para o menor; quando se encontrar um pico, ou seja, um valor substancialmente maior do que o anterior, volta-se um passo; o valor correspondente observado no eixo dos grupos é o número de grupos ideal (SAS Institute Inc., 2008).

O método CCC é exclusivo do programa SAS e não é usualmente abordado na literatura disponível sobre análise de agrupamentos (Mingoti, 2007). Esse método não funciona muito bem quando o número de observações por grupo é menor do que dez. A melhor maneira de usar este critério é construindo-se um gráfico, semelhante ao usado para a estatística Pseudo T^2 ; ou seja, plota-se o valor de CCC *versus* o número de grupos. Algumas interpretações dos resultados possíveis de serem observados são: picos de CCC maiores do que 2,0 ou 3,0 indicam bons grupos; picos de CCC entre 0,0 e 2,0 indicam possíveis grupos, mas devem ser interpretados com cautela; se houver vários picos é uma indicação de que os dados possuem uma estrutura hierárquica; valores abaixo de -30, podem indicar a presença de dados discrepantes; e se o valor de CCC cresce continuamente

com o aumento do número de grupos, a distribuição pode ser muito particulada (Searle, 1993).

Outro critério bastante utilizado é a análise da soma de quadrados entre grupos, ou coeficiente R^2 . Define-se o coeficiente R^2 de uma partição pela relação entre a soma de quadrados total entre os g grupos e a soma de quadrados total corrigida para a média global em cada variável. Observa-se que, quanto maior o valor de g , menor será a variabilidade interna dos grupos e, portanto, maior será o valor de R^2 , atingindo-se o valor máximo quando $g = n = 1$, em que n é o número de indivíduos. Da mesma forma que os critérios anteriores, recomenda-se a construção de um gráfico, buscando pontos de saltos relativamente grandes, os quais indicam possíveis momentos de parada do algoritmo de agrupamento (Mingoti, 2007).

3 CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes guianensis*

RESUMO

A espécie *Stylosanthes guianensis* [(Aubl.) Sw.] é uma leguminosa que ocorre naturalmente no continente americano, do México até a Argentina, e tem, no Cerrado brasileiro, o seu centro de diversidade. Pode ser usada em diversos sistemas de produção, entretanto, o número de cultivares existentes no Brasil é bastante reduzido e não reflete a disponibilidade de acessos mantidos *ex situ* nos bancos de germoplasma. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica de 535 acessos de *S. guianensis*, disponíveis na Embrapa Cerrados e na coleção de base da Embrapa; estabelecer grupos de acessos com características semelhantes; indicar grupos de acessos com maior potencial agrônomo e identificar possíveis duplicatas na coleção. As avaliações foram conduzidas na Embrapa Cerrados, em Planaltina-DF, em dois plantios, realizados nos anos de 2003 e 2006, com 501 acessos comuns aos dois plantios e mais 34 acessos no plantio de 2006, utilizando-se como testemunhas quatro genótipos conhecidos e fenotipicamente bastante divergentes. Foram mensurados 23 caracteres morfoagronômicos e seus dados foram analisados utilizando-se a análise de componentes principais; o método de agrupamento aglomerativo de Ward; e a análise de variância univariada, associada ao teste de Tukey, para avaliar os efeitos dos grupos sobre as variáveis e comparar as médias dos grupos entre si. Pela análise de componentes principais, foi possível descartar seis variáveis que pouco contribuíram para a variabilidade genotípica total entre os acessos. Considerando-se as 17 variáveis restantes, foram necessários cinco componentes principais para explicar 73,1% da variância total. Mesmo assim, o gráfico de dispersão dos acessos em relação aos dois primeiros componentes (55,7%) evidenciou a grande variabilidade fenotípica existente na coleção, sobretudo em relação às testemunhas. Foi possível identificar acessos com maior porte do que a cultivar Mineirão, referência de produção de forragem para a espécie. Pela análise de agrupamento, utilizando as 17 variáveis, foram estabelecidos treze grupos de similaridade e, considerando-se os primeiros passos do algoritmo de aglomeração, identificaram-se pares de acessos que se caracterizaram como possíveis duplicatas, merecendo investigação genético-molecular para essa confirmação. Observando-se as médias das características fenotípicas de cada grupo, a dispersão dos acessos e o círculo de correlações das variáveis, mesmo considerando-se apenas os dois primeiros componentes principais, verificou-se grande concordância entre as análises de componentes principais e de agrupamento. Cinco grupos foram considerados de maior potencial para a utilização nos seguintes sistemas agrícolas: (i) produção de forragem e adubação verde (Grupos 2, 3 e 10), (ii) integração lavoura-pecuária (Grupo 4), e (iii) plantas de cobertura (Grupo 7). Assim, é possível reduzir o número de acessos a serem avaliados para estas finalidades, de 535 para 89, 17 e 20 acessos, respectivamente. Essa redução no tamanho da coleção de trabalho permitirá aumentar a eficiência e a eficácia nas avaliações experimentais com objetivos agrônômicos, podendo, ainda, estimular outras pesquisas com todos os materiais armazenados no banco de germoplasma.

Palavras-chave: recursos genéticos, leguminosa tropical, forrageira, análise multivariada.

ABSTRACT

MORPHO-AGRONOMIC CHARACTERIZATION OF *Stylosanthes guianensis*
ACCESSIONS

Stylosanthes guianensis [(Aubl.) Sw.] is a legume species, that occurs naturally in the Americas, spreading from Mexico to Argentina, with its diversity center located in the Brazilian *Cerrado*. It is used in several production systems, however, the number of available cultivars in Brazil is very small, not reflecting the large number of germplasm accessions stored on the germplasm banks. The objective of this research was to evaluate the phenotypic diversity of 535 accessions of *S. guianensis* available at the Embrapa germplasm collection, establish groups of accessions with similar characteristics, indicate groups of accessions with the greatest agronomic potential, and identify possible duplicates in the collection. The studies were carried out at Embrapa Cerrados in Planaltina-DF, Brazil, using two sowing date of germplasm (501 identical accessions), established in 2003 and 2006, and using four very phenotypically distinct genotypes as controls. Twenty-three morpho-agronomic traits were used to characterize the genetic diversity of the germplasm. The data were analyzed by a principal component analysis (PCA), the Ward's agglomerative hierarchical clustering method, the univariate analysis of variance to verify the group effects on the variables, and a Tukey test for comparisons among group means. The PCA showed that six variables out of 23 presented a small contribution to the total variance among accessions. Taking in account the seventeen remaining variables, the first five principal components (PCs) were responsible for 73.1% of the total variation. The dispersion graph of the accessions for the first two principal components, with 55.7% of this variation, depicted the great phenotypic variability presented in this collection, mainly when compared to the control genotypes. It was possible to identify accessions with plant stature higher than cultivar Mineirão, which is a forage production reference for the species. Thirteen groups of similarity were established using the Ward's agglomerative hierarchical clustering method applied on the seventeen variables. Considering the first steps of the agglomerative algorithm of clustering, pairs of accessions that can represent duplicates were identified, and a genetic-molecular analysis is required for this confirmation. The analysis of the phenotypic means for each trait and group, compared to the dispersion of the accessions and correlations of the variables, for the first two principal components, allowed to verify that there was good agreement between the PCA and cluster analyses. Five groups were considered with potential use in the following agricultural systems: (i) forage production and green manure (Groups 2, 3 and 10), (ii) crop-livestock integration (Group 4), and (iii) cover crops (Group 7). Therefore, it is possible to reduce the work collection size, for these objectives, from 535 accessions to 89, 17 and 20, respectively. This reduction will increase the efficiency and effectiveness in the agronomic evaluations and, furthermore, stimulate additional research of all materials stored in the Germplasm Bank.

Key words: genetic resources, tropical legume, forage, multivariate analysis.

3.1 INTRODUÇÃO

O sistema de produção da pecuária brasileira é baseado em pastagens que, em relação aos sistemas confinados, oferece grande vantagem competitiva, permitindo a geração de produtos de boa qualidade e com baixo custo (Euclides et al., 2001). Essa vantagem é obtida, principalmente, devido à abundância de terras ainda disponíveis no Brasil e pelo constante incremento tecnológico introduzido na produção e industrialização dos produtos da pecuária.

Por outro lado, observa-se que extensas áreas de pastagens, principalmente na região do Cerrado, têm diminuído a capacidade produtiva. Muitas dessas áreas apresentam elevado grau de degradação, comprometendo o meio ambiente e diminuindo a qualidade de vida das populações (Barcellos et al., 2001; Vilela, 2004; Macedo, 2005). O desenvolvimento de alternativas para a manutenção ou restabelecimento da capacidade produtiva das pastagens cultivadas é fundamental para se alcançar a sustentabilidade dessa atividade no Brasil. A adubação com fertilizantes químicos, isoladamente, não parece ser uma solução viável para a recuperação das extensas áreas ocupadas com pastagens. O uso de leguminosas para a incorporação de nitrogênio atmosférico e a integração dos sistemas de produção de grãos com a pecuária podem ser opções complementares à anterior (Spain, 1990; Barcellos et al., 2000b; Vilela, 2004).

A utilização de leguminosas, em pastagens, além da incorporação de nitrogênio no solo, também contribui para melhorar a qualidade da dieta animal, já que possuem maior teor protéico do que as gramíneas. Leguminosas são amplamente empregadas em pastagens de regiões de clima temperado, entretanto, em áreas tropicais, essa prática ainda é pouco difundida. A utilização incipiente de leguminosas nos sistemas produtivos tropicais não reflete, porém, a grande diversidade biológica disponível e avaliada nas instituições de pesquisa (Spain, 1988).

A flora brasileira é extremamente rica em leguminosas e o Brasil é, inclusive, centro de origem de diversas espécies que poderiam ser usadas no estabelecimento de pastagens. Dentre estas leguminosas nativas, destaca-se o gênero *Stylosanthes* (Edye et al., 1984; Karia & Andrade, 1996), que possui várias espécies amplamente distribuídas pelo continente americano (Costa, 2006).

Em avaliações agronômicas realizadas na região do Cerrado, as espécies *S. capitata* (Vogel), *S. macrocephala* (Ferreira & Sousa Costa) e, principalmente, *S.*

guianensis [(Aubl.) Sw.] demonstraram ampla adaptação e valor forrageiro. Essas espécies também possuem grande potencial de utilização em outros sistemas agrícolas, como em adubação verde, planta de cobertura das entrelinhas em culturas perenes e de proteção do solo, bem como para recuperação de áreas degradadas (Cameron & Chakraborty, 2004). A espécie *S. guianensis* é preferencialmente autógama (Miles, 1985), possui genótipos que se destacam pela tolerância à seca e pela produção de forragem, além de apresentar alta diversidade fenotípica (Andrade et al., 2004; Karia et al., 2002).

O Banco de Germoplasma da Embrapa possui mais de mil acessos registrados de *S. guianensis*. Entretanto, muitos desses acessos provavelmente sejam duplicatas, o que ocorre com relativa frequência na maioria dos bancos de germoplasma do mundo (Peeters & Williams, 1984). Apesar do grande número de acessos disponíveis, das seis cultivares lançadas, desde o início da década de 1930, somente a cultivar Mineirão tem sido comercializada no Brasil (Karia et al., no prelo).

A baixa utilização dos acessos armazenados *ex situ*, nos bancos de germoplasma, é um problema mundial, que acomete todas as espécies vegetais. As principais causas do problema são discutidas por Peeters & Williams (1984); van Sloten (1987) e Humphreys (2003). Segundo Frankel (1989), a eficiência dos bancos de germoplasma depende da força dos programas de melhoramento genético. Nesse sentido, os trabalhos de caracterização, avaliação, multiplicação, conservação e manutenção de banco de dados são essenciais (Frankel, 1984), não somente para estimular a utilização desses acessos, mas também para orientar a tomada de decisões que otimizem as dispendiosas atividades em um banco de germoplasma (Sackville Hamilton et al., 2002).

A abordagem multivariada para as análises dos dados obtidos nas avaliações de coleções de germoplasma é a mais adequada, uma vez que são mensurados vários caracteres em uma mesma unidade amostral. Os métodos mais utilizados são as medidas de distâncias, análises por componentes principais, análise por variáveis canônicas, análise de correspondência e os métodos de agrupamento (Moreira et al., 1994; Cruz et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os acessos de *S. guianensis* existentes na Embrapa Cerrados e na Coleção de Base da Embrapa, utilizando-se caracteres morfoagronômicos; e, a partir disso, verificar a variabilidade fenotípica presente na coleção; estabelecer grupos de acessos com características morfoagronômicas semelhantes; indicar grupos de acessos com maior potencial agrônomo; e identificar possíveis duplicatas entre os acessos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizando-se dados de passaporte dos registros de aproximadamente 1.200 acessos de *S. guianensis*, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Forrageiras da Embrapa Cerrados e da Coleção de Base da Embrapa, foram identificadas várias duplicatas e, considerando-se também a disponibilidade e qualidade das sementes, foi possível selecionar 535 acessos, que constituem o material experimental desta pesquisa.

Os acessos foram estabelecidos nos anos de 2003 e 2006, na área experimental da Embrapa Cerrados, em Planaltina, Distrito Federal (15°36'05'' de latitude sul, 47°42'32'' de longitude oeste, a 990 m de altitude). As sementes foram escarificadas mecanicamente, utilizando-se lixa d' água nº180 e colocadas em caixas do tipo Gerbox, de acrílico transparente, forradas com duas folhas de papel de filtro, para germinarem. Antes de receberem as sementes, as caixas foram lavadas com água e sabão e mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio. Após a germinação das sementes, quando o comprimento total das plântulas atingiu aproximadamente 2,0 cm, foram transplantadas em bandejas para mudas, perfuradas com 72 células (6 x 12) e mantidas em casa de vegetação. Todos esses procedimentos foram realizados para garantir a sobrevivência das plantas e evitar a perda de acessos. Isso porque, para alguns deles, a quantidade de sementes era muito pequena e parte destas sementes estavam armazenadas desde o final da década de 1970, sem refrigeração ou controle de umidade, gerando dúvidas quanto à sua qualidade.

Após, aproximadamente, setenta dias em casa de vegetação, as plantas foram transplantadas para o campo, em área de Latossolo Vermelho Escuro, com fertilidade corrigida. Para a amostragem e correção química do solo, a área experimental foi dividida em oito subáreas (talhões), tomando-se, em cada uma, vinte subamostras de solo, à profundidade de 0-20 cm, para compor uma amostra. De acordo com os resultados da análise química de cada talhão, foi feita a aplicação de calcário dolomítico, para se atingir uma saturação por bases de 35%, e, também, a adubação de correção do solo, com potássio, fósforo e micronutrientes, de acordo com as recomendações descritas por Sousa et al. (2001).

Nos dois plantios, cada parcela correspondeu a uma única linha de plantas, com sete e cinco plantas, respectivamente, em 2003 e 2006, espaçadas de 0,7 m entre si. A distância entre parcelas adjacentes foi de 1,5 m. Apenas durante o primeiro ano, as plantas foram mantidas em condições irrigadas, para garantir o seu estabelecimento.

De acordo com o histórico de uso da área e da fertilidade inicial do solo, a área foi dividida em quatro blocos de diferentes tamanhos. Em cada bloco, foram alocados aleatoriamente quatro tratamentos comuns, a saber: as cultivares Bandeirante (CPAC 135) e Mineirão (CPAC 1230), e os acessos CPAC 1371 e CPAC 4144, representando, respectivamente, as variedades botânicas *pauciflora*, *guianensis*, *microcephala* e *canescens*. Os demais tratamentos (acessos sob avaliação) foram alocados, por sorteio, às parcelas remanescentes dos quatro blocos, porém sem repetição, caracterizando um delineamento experimental de blocos incompletos, mais especificamente conhecido como blocos aumentados (Federer, 1956; Duarte, 2000). No plantio de 2003 foram avaliados 501 acessos e, no de 2006, foram adicionados mais 34 acessos, totalizando 535 acessos avaliados. O plantio de 2006 foi feito em área adjacente àquela do plantio de 2003, com as mesmas recomendações de correção e adubação do solo.

No plantio de 2003, entre 100 e 120 dias após serem levadas ao campo, todas as plantas foram avaliadas quanto à sua altura (ALT), comprimento do eixo central (EIXO), comprimento da primeira ramificação primária (CR), todas medidas em centímetros, e número de ramos primários inseridos nos primeiros dez centímetros do eixo central (NR). No plantio de 2006, ainda em casa de vegetação, entre 60 e 70 dias após o plantio nas bandejas, foram feitas medições do comprimento e largura do folíolo central (CFC1 e LFC1, respectivamente) e do comprimento e largura do folíolo lateral direito (CFL1 e LFL1, respectivamente), todos tomados em milímetros. No campo, foram realizadas as mesmas avaliações do plantio de 2003, acrescentando-se as medições do maior diâmetro das plantas (DP), em centímetros, todas entre 100 a 120 dias após o plantio. Também foram repetidas, no campo, as medições do comprimento e largura dos folíolos central e lateral direito (CFC, LFC, CFL e LFL).

A avaliação da fenologia do florescimento foi realizada, em nível de parcelas, visitando-as quinzenalmente, no período da manhã, entre 13/abr./2007 e 25/jul./2007. Foram observados o início do florescimento (IF), definido como o momento em que todas as plantas apresentavam, pelo menos, dez flores; e o pleno florescimento (PF), momento em que todas as plantas apresentavam mais de cem flores. Após 25/jul./2007, as parcelas continuaram sendo observadas, porém com menor frequência. Nessa avaliação, atribuiu-se o valor um às parcelas em que IF ou PF ocorreram antes do mês de abril; valor dois, às parcelas com florescimento na primeira quinzena de abril; e assim por diante, até o valor

dez para parcelas que floresceram após a segunda quinzena de julho; e, ainda, o valor onze às parcelas cujas plantas não floresceram no primeiro ano de avaliação.

Após a colheita e limpeza das sementes, foi obtido o peso de cem sementes (PCS), em gramas, com quatro repetições, utilizando-se as sementes com a casca (lomento), em balança de precisão.

Foram, ainda, derivadas outras sete variáveis: a relação entre o comprimento e a largura do folíolo central, em casa de vegetação e no campo (RCLC1 e RCLC); a relação entre o comprimento e a largura do folíolo lateral direito, em casa de vegetação e no campo (RCLL1 e RCLL); a relação entre o diâmetro e a altura da planta (RDA); a relação entre o comprimento do primeiro ramo e o comprimento do eixo central (RRA); e, por fim, o intervalo entre o início e o pleno florescimento (INT). Assim, os descritores avaliados totalizaram 23 variáveis.

Para a análise estatística dos dados, primeiramente, foram obtidas as médias ajustadas dos acessos, para cada variável, considerando o delineamento experimental e os dois anos avaliação. Assim, essas médias foram estimadas por quadrados mínimos, mediante o ajuste de um modelo misto de análise conjunta de variância, em que se admitiu efeito fixo para os acessos e efeitos aleatórios para ano, bloco dentro de anos e interação acesso x ano. Ademais, assumiram-se erros experimentais independentes, homocedásticos e normalmente distribuídos. Na estimação dos componentes de variância do modelo, utilizou-se o método da máxima verossimilhança restrita (REML). Naturalmente, quando a variável foi mensurada em apenas um ano, o ajuste das médias levou em conta apenas o efeito de blocos. A obtenção destas médias foi computacionalmente implementada utilizando-se o procedimento *PROC MIXED* do SAS – *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 2008) e, mais especificamente, o seu comando *LSMEANS*.

Para avaliar a divergência genética entre os acessos e classificá-los em grupos de similaridade, foram utilizadas técnicas multivariadas, como a análise por componentes principais e o método de agrupamento hierárquico aglomerativo de Ward. Na análise de componentes principais, utilizou-se a matriz de correlações, com dados centrados e reduzidos (Jolliffe, 2004). Após uma primeira análise, com base no método de Jolliffe (1973) modificado por Cury (1993), na matriz de correlações e na importância relativa do caráter para a análise do potencial agrônomo dos acessos, foram descartadas as variáveis que não contribuíram substancialmente para a diferenciação entre eles. No método de Jolliffe (1973) modificado por Cury (1993), a cada descarte, é realizada uma nova análise

com os caracteres remanescentes, sendo obtidos, assim, novos autovalores. O procedimento é repetido até que restem apenas os componentes principais cujos autovalores acumularam de 70% a 80% da variação total.

A análise de agrupamento pelo método de Ward foi realizada para a formação dos grupos de acessos. Para a visualização do processo aglomerativo foi construído um dendrograma com os valores da estatística *correlação semiparcial ao quadrado* e os respectivos nós de cada passo do algoritmo. Esta estatística corresponde à proporção da soma de quadrados entre os grupos que se uniram para a formação de um novo agrupamento, em relação à soma total dos quadrados médios. É a medida mais adequada para a construção de dendrogramas, quando o método de agrupamento utilizado for o de Ward (SAS Institute Inc., 2008). Para a definição do número de grupos a ser adotado – corte no dendrograma (decisão do momento de parada do algoritmo de aglomeração), foram utilizadas as estatísticas Pseudo F (PSF), Pseudo T^2 (PST2) ou $Je(2)/Je(1)$, CCC (*cubic clustering criterion*) (Sarle, 1983) e a correlação semiparcial ao quadrado (SPRSQ) (Mingoti, 2007). Os três primeiros são explicitados por Milligan e Cooper (1985), por Crossa e Franco (2004) e por Mingoti (2007). Após a definição dos grupos, análises de variância (univariadas) foram realizadas para se avaliar os efeitos dos grupos sobre cada variável. Em seguida, foram feitas também as comparações entre as médias dos grupos, para cada variável, utilizando-se o teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. Essas análises tiveram como objetivo facilitar a interpretação e a avaliação dos diferentes grupos, quanto ao potencial agrônômico de cada um. Todas essas análises foram também executadas utilizando-se o aplicativo computacional SAS versão 9.1.3.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando-se a matriz de correlações entre as 23 variáveis iniciais (Tabela 3.1), verifica-se que houve forte correlação positiva ($r \geq 0,95$) entre as medidas de comprimento dos folíolos central e lateral, bem como entre as medidas da largura dos folíolos central e lateral, tanto para os dados tomados em condições de casa de vegetação (CFC1 e CFL1; LFC1 e LFL1) como no campo (CFC e CFL; LFC e LFL). Da mesma forma, as relações entre comprimento e largura dos folíolos central e lateral, em casa de vegetação (RCLC1 e RCLL1) e no campo (RCLC e RCLL), também apresentaram-se fortemente correlacionados ($r > 0,85$). Por outro lado, quando se comparam os dados dos

Tabela 3.1. Coeficientes de correlação fenotípica entre 23 caracteres morfoagronômicos¹, avaliados em 535 acessos de *Stylosanthes guianensis*, em Planaltina-DF (15°36'05''S, 47°42'32''W e 990 m de altitude), em 2003 e 2006.

Caracteres	ALT	EIXO	NR	CPR	LFC	CFC	LFL	CFL	DP	RCLC	RCLL	RDA	RRE	PCS	CFC1	LFC1	CFL1	LFL1	RCLC1	RCLL1	IF	PF
EIXO	0,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NR	-0,15	-0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPR	0,41	0,81	-0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFC	0,39	0,31	-0,05	0,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFC	0,57	0,38	-0,02	0,41	0,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFL	0,36	0,29	0,04	0,32	0,95	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFL	0,56	0,35	-0,01	0,40	0,63	0,97	0,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DP	0,40	0,60	0,04	0,74	0,45	0,56	0,47	0,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RCLC	0,14	0,01	0,11	0,02	-0,52	0,32	-0,42	0,26	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RCLL	0,16	0,01	-0,01	0,02	-0,50	0,25	-0,52	0,27	0,02	0,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RDA	-0,70	-0,02	0,12	-0,06	-0,20	-0,25	-0,18	-0,27	0,08	-0,04	-0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RRE	-0,04	-0,46	0,22	0,12	-0,02	-0,02	0,00	0,01	0,09	-0,01	0,01	-0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCS	0,19	0,02	-0,15	-0,07	0,11	0,24	0,12	0,23	0,05	0,08	0,10	-0,08	-0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFC1	0,53	0,37	-0,24	0,35	0,32	0,53	0,29	0,51	0,36	0,14	0,19	-0,31	-0,11	0,26	-	-	-	-	-	-	-	-
LFC1	0,34	0,26	-0,08	0,27	0,62	0,31	0,57	0,33	0,26	-0,40	-0,37	-0,27	-0,03	-0,18	0,48	-	-	-	-	-	-	-
CFL1	0,55	0,38	-0,22	0,37	0,33	0,53	0,30	0,51	0,36	0,13	0,18	-0,34	-0,09	0,25	0,98	0,49	-	-	-	-	-	-
LFL1	0,33	0,28	-0,10	0,29	0,60	0,28	0,56	0,30	0,26	-0,41	-0,38	-0,27	-0,03	-0,18	0,48	0,96	0,49	-	-	-	-	-
RCLC1	-0,04	-0,10	-0,13	-0,15	-0,50	-0,06	-0,48	-0,09	-0,13	0,50	0,52	0,09	-0,08	0,39	0,09	-0,79	0,07	-0,73	-	-	-	-
RCLL1	-0,03	-0,13	-0,09	-0,18	-0,49	-0,04	-0,47	-0,07	-0,15	0,51	0,52	0,07	-0,09	0,38	0,06	-0,75	0,06	-0,78	0,92	-	-	-
IF	-0,28	-0,13	0,02	-0,12	-0,21	-0,09	-0,16	-0,09	0,05	0,14	0,12	0,32	0,03	0,18	-0,31	-0,55	-0,31	-0,56	0,41	0,43	-	-
PF	-0,20	-0,13	0,02	-0,14	-0,11	0,00	-0,07	0,00	0,10	0,14	0,10	0,27	0,00	0,24	-0,26	-0,55	-0,27	-0,55	0,45	0,47	0,89	-
INT	0,19	0,01	0,00	-0,03	0,22	0,20	0,21	0,18	0,10	-0,02	-0,05	-0,14	-0,05	0,12	0,13	0,06	0,13	0,07	0,04	0,04	-0,33	0,14

¹ ALT: altura da planta; EIXO: comprimento do eixo; NR: número de ramos primários inseridos nos primeiros dez centímetros do eixo central; CPR: comprimento da primeira ramificação primária; LFC: largura do folíolo central; CFC: comprimento do folíolo central; LFL: largura do folíolo lateral; CFL: comprimento do folíolo lateral; DP: diâmetro da planta; RCLC: relação CFC/LFC; RCLL: CFL/LFL; RDA: relação DP/ALT; RRE: relação CPR/EIXO; PCS: peso de cem sementes; IF: início do florescimento; PF: florescimento pleno; INT: intervalo entre o início e pleno florescimento; o número 1 nesses rótulos indica medidas tomadas em casa de vegetação).

folíolos tomados em casa de vegetação com os dados tomados no campo, essas correlações foram relativamente baixas (entre 0,50 e 0,62), indicando que os tamanhos dos folíolos se modificam nas diferentes condições, e/ou, com a idade da planta. Os valores dessas correlações obtidos em casa de vegetação, em geral, foram maiores do que os obtidos no campo. Outras correlações foram de magnitude elevada, como entre ALT e RDA (-0,70), CPR e EIXO (0,81), DP e CPR (0,74), RCLC1 e LFC1 (-0,79), e entre PF e IF (0,89), embora algumas delas sejam decorrentes do próprio fato de uma variável ser função linear da outra.

Utilizando-se o método proposto por Jolliffe (1973) modificado por Cury (1993) e, também, observando-se os dados da matriz de correlações e considerando-se a importância do caráter para os objetivos do trabalho, das 23 variáveis iniciais, foram descartadas LFL1, LFL, RCLL1, RCLL, CFL1 e LFL1. Essas exclusões indicam que nenhuma medida do folíolo lateral contribui substancialmente para a discriminação dos acessos, de modo que não necessitam ser tomadas, o que facilita o processo de avaliação. Tomando-se como base a contribuição da variável para o último componente principal, a variável IF também deveria ser descartada, porém, dada a sua importância agrônômica e a necessidade de sua avaliação para se estimar o intervalo entre o início e o pleno florescimento (INT), este descritor foi mantido. A análise do décimo sétimo e décimo sexto componentes principais indicou, ainda, o descarte dos descritores comprimento do eixo (EIXO) e comprimento da primeira ramificação (CPR), respectivamente; contudo, pelas mesmas razões da variável IF, estas também foram mantidas. Assim, optou-se por não mais descartar variáveis e considerar, para as análises, as dezessete restantes.

Na análise de componentes principais, o primeiro componente respondeu por 27,64% da variação total. Os dois, três, quatro e cinco primeiros componentes acumularam, respectivamente, 44,33%, 55,72%, 64,46% e 73,10% da variância total. Considerando-se os cinco primeiros componentes principais, as variáveis que mais contribuíram para a representação dos acessos foram, em ordem decrescente: comprimento do eixo (EIXO), comprimento da primeira ramificação primária (CPR), florescimento pleno (PF), início do florescimento (IF), diâmetro da planta (DP), largura do folíolo central (LFC), relação entre comprimento e largura do folíolo central em casa de vegetação (RCLC1), altura da planta (ALT), relação entre comprimento e largura do folíolo central no campo (RCLC), comprimento do folíolo central (CFC), largura do folíolo central em casa de vegetação (LFC1), comprimento do folíolo central em casa de vegetação (CFC1),

relação entre diâmetro e altura da planta (RDA), peso de cem sementes (PCS), relação entre os comprimentos da primeira ramificação primária e do eixo (RRE), número de ramos primários inseridos nos primeiros dez centímetros do eixo central (NR) e intervalo entre o início e pleno florescimento (INT).

Pela representação gráfica dos vetores das variáveis, em relação aos dois primeiros componentes principais (Figura 3.1), no chamado círculo de correlações (com variância máxima igual a 1,0), observa-se que não houve variável altamente correlacionada com quaisquer destes dois componentes. Os maiores valores para a soma das correlações ao quadrado (R^2), em relação aos dois primeiros componentes principais, foram 0,22 para RCLC1 e 0,21 para LFC1. Isso significa que todas as variáveis foram importantes para a representação da dispersão dos acessos, em relação a estes dois componentes, sendo que INT, NR e RRE tiveram, relativamente, menor importância. Nota-se, também, que os caracteres relacionados ao porte da planta (ALT, DP, EIXO, CPR, CFC e CFC1) estão correlacionados entre si, se concentrando no quadrante superior direito do gráfico. As variáveis relacionadas ao tempo para o florescimento (IF e PF), no quadrante superior esquerdo, também estão correlacionadas entre si, mas mostram-se relativamente independentes das variáveis anteriormente identificadas.

Em relação à dispersão dos acessos (Figura 3.1), nota-se que, em relação aos dois primeiros componentes principais, não houve clara estruturação de grupos. Entretanto, cabe ressaltar que estes componentes representam apenas 55,72% da variância total, implicando, portanto, 44,28% de distorção neste nível de representação. Observa-se que, do lado esquerdo do gráfico, há uma maior concentração de acessos próximos ao primeiro componente. Considerando-se simultaneamente o círculo de correlação das variáveis, conforme recomendado por Jolliffe (2004), pode-se inferir que estes acessos são, provavelmente, mais tardios e de menor porte; sobretudo os mais afastados da origem dos eixos. De modo análogo, do lado direito do gráfico, os acessos pertencentes ao quadrante superior devem ser de maior porte e com folíolos mais largos do que os anteriores, principalmente os mais afastados em relação à origem. Ademais, nota-se que há um equilíbrio entre o número de acessos em ambos os lados do gráfico, 270 do lado esquerdo e 265 do lado direito, porém do lado direito os acessos estão mais dispersos, indicando maior variabilidade entre eles.

Os acessos usados como testemunhas (Bandeirante, Mineirão, CPAC 1371 e CPAC 4144), identificados na Figura 3.1, representaram bem a variabilidade dos acessos, distribuindo-se na nuvem de dispersão dos acessos, sobretudo ao longo do primeiro eixo principal, tal como os demais acessos, de maneira geral. Considerando-se que esses acessos são, reconhecidamente, bastante distintos fenotipicamente entre si, em relação às variáveis vinculadas ao tamanho da planta, que se mostraram mais associadas com o primeiro componente, pode-se concluir que a variabilidade existente na coleção é bastante grande. Isso porque existem vários acessos representados em regiões periféricas da dispersão, em quaisquer direções, muito além da amplitude expressa pelos acessos testemunhas.

Além disso, observa-se que a cultivar Mineirão, atual referência de produção de forragem em *Stylosanthes*, está representada em uma posição intermediária no quadrante superior direito, tal como as variáveis ALT, DP, EIXO, CPR, CFC e CFC1. Nota-se, entretanto, que existem acessos em posições inclusive mais afastadas da origem, nessa mesma direção, e que compartilham características semelhantes. Por isso, tais acessos devem ser mais bem estudados para características de produção de forragem, pois, provavelmente, possuem maior porte do que a cultivar Mineirão.

Nos resultados obtidos por Karia et al. (2002), que avaliaram 62 acessos de *S. guianensis* para doze caracteres morfoagronômicos, sendo onze comuns ao presente trabalho, também em Planaltina-DF, a cultivar Mineirão ficou totalmente isolada na representação gráfica da dispersão dos acessos nos dois primeiros componentes principais; e a cultivar Bandeirante também se posicionou na periferia da nuvem de pontos. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho indicam, portanto, maior variabilidade fenotípica da atual coleção em estudo.

A análise de agrupamento pelo método de Ward associada aos critérios de definição do número de grupos, as estatísticas CCC, Pseudo T^2 e a observação da estabilização da correlação semiparcial ao quadrado (SPRSQ) (Figura 3.2), indicaram a presença de cerca de treze grupos de acessos. A estatística Pseudo F apresentou um pico com dois grupos e depois uma diminuição gradual do seu valor, com o aumento do número de grupos, não indicando, portanto, uma estrutura natural de partição dos acessos. Assim, apenas os outros três critérios foram efetivamente utilizados nessa definição.

Examinando-se os valores de SPRSQ, nota-se que existem pontos de estabilização em 14, 9, 5 e 2 grupos (no método aglomerativo, recomenda-se caminhar no

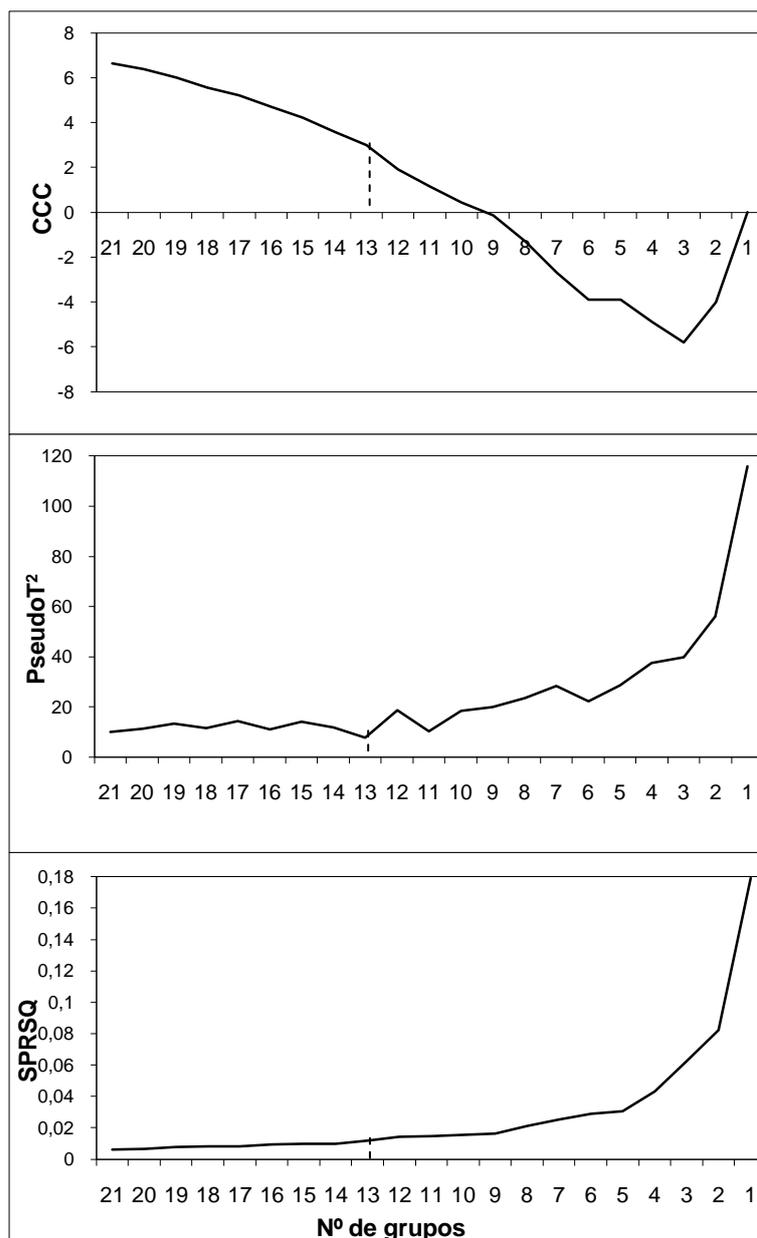


Figura 3.2. Representação gráfica dos valores de CCC (*cubic clustering criterion*), Pseudo T^2 e da correlação semiparcial ao quadrado (SPRSQ), em relação aos passos do algoritmo de agrupamento pelo método de Ward, aplicado a uma coleção de 535 acessos de *Stylosanthes guianensis*.

gráfico, da esquerda para a direita), indicando maior distanciamento relativo para a junção de dois grupos, o que pode denotar alguma estruturação. Pelos valores de Pseudo T^2 , nota-se que os maiores saltos ocorrem nos pontos correspondentes a 12, 10, 5, 4, 3 e 2 grupos, indicando que os possíveis momentos de parada do algoritmo estão nos passos anteriores, ou seja, 13, 11, 6, 5, 4 e 3. Por fim, considerando a estatística CCC, constata-se que, com 13 grupos, o seu valor atinge 2,98, praticamente três, valor considerado adequado (Searle, 1983). Nota-se, também, que a inclinação da reta entre treze e doze grupos é ligeiramente

maior do que nos demais passos em que o valor de CCC é positivo, indicando que o algoritmo deve parar no passo anterior, ou seja, também em treze grupos. Observa-se ainda que o valor de CCC cresce continuamente com o aumento do número de cluster, demonstrando que a distribuição dos acessos em grupos é muito fracionada (Searle, 1983).

Observando-se o dendrograma obtido pela análise de agrupamento (Figura 3.3), mesmo com a constatação do fracionamento dos acessos em vários grupos, foi possível verificar que a partição em treze grupos é bastante razoável.

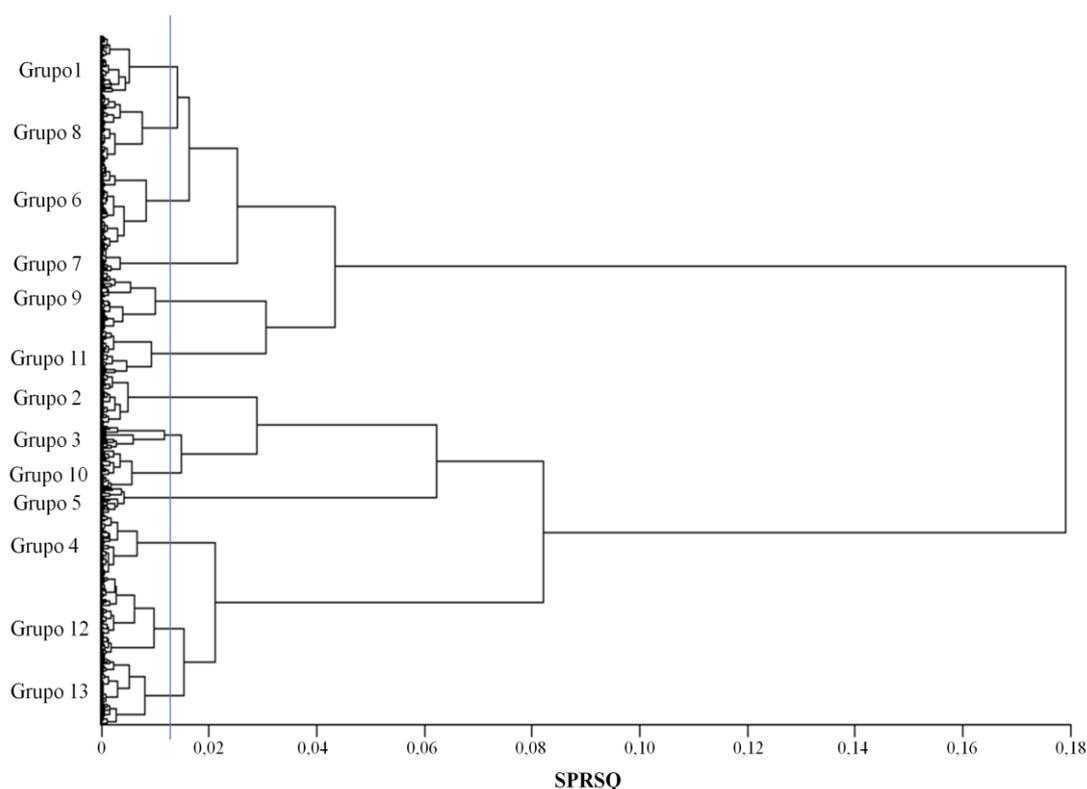


Figura 3.3. Dendrograma do agrupamento de 535 acessos de *Stylosanthes guianensis*, pelo método de Ward, utilizando-se 17 caracteres morfoagronômicos, em relação à correlação semiparcial ao quadrado (SPRSQ). A reta vertical representa o momento de parada do algoritmo para a formação de treze grupos de acessos.

Nota-se que os acessos participantes das primeiras junções são extremamente semelhantes entre si, podendo indicar possíveis duplicatas. Assim, decidiu-se que os acessos reunidos nos primeiros passos do algoritmo de agrupamento, cujos valores de SPRSQ foram inferiores a 0,0002 (Tabela 3.2), devem ser investigados nesse sentido, inicialmente por minuciosa verificação dos dados de passaporte.

Tabela 3.2. Histórico dos 58 primeiros passos do agrupamento de 535 acessos, identificados pelo nº CPAC, de *Stylosanthes guianensis*, pelo método de Ward, e os valores da correlação semiparcial ao quadrado (SPRSQ) e da correlação ao quadrado (RSQ) para cada passo.

Nº de Grupos	Junção entre acessos ou grupos*		SPRSQ	RSQ
	CPAC/Grupo	CPAC/Grupo		
534	1354	1381	0,0000	1,000
533	4263	4267	0,0000	1,000
532	5439	5467	0,0001	1,000
531	2730	5398	0,0001	1,000
530	5411	5412	0,0001	1,000
529	1125	1134	0,0001	1,000
528	1380	2748	0,0001	1,000
527	1365	1619	0,0001	1,000
526	5485	5596	0,0001	0,999
525	4334	4337	0,0001	0,999
524	5487	5493	0,0001	0,999
523	NG533	4265	0,0001	0,999
522	1152	5604	0,0001	0,999
521	5218	5235	0,0001	0,999
520	5462	5466	0,0001	0,999
519	4157	4232	0,0001	0,999
518	5440	5441	0,0001	0,999
517	4327	4328	0,0001	0,999
516	NG528	2750	0,0001	0,998
515	5470	5475	0,0001	0,998
514	5489	5403	0,0001	0,998
513	4171	5418	0,0001	0,998
512	4300	4301	0,0001	0,998
511	2735	5381	0,0001	0,998
510	5442	5449	0,0001	0,998
509	1128	1129	0,0001	0,998
508	665	2741	0,0001	0,998
507	2205	2762	0,0001	0,997
506	4176	4268	0,0001	0,997
505	5520	5521	0,0001	0,997
504	5500	5501	0,0001	0,997
503	5482	5483	0,0001	0,997
502	2732	5400	0,0001	0,997
501	5272	5576	0,0001	0,997
500	1154	2769	0,0001	0,997
499	5391	5392	0,0001	0,996
498	4187	4293	0,0001	0,996
497	5443	5446	0,0001	0,996
496	2774	5571	0,0001	0,996
495	NG497	5453	0,0001	0,996
494	NG534	2204	0,0001	0,996
493	1116	2724	0,0001	0,996
492	1353	5544	0,0001	0,995
491	4233	5224	0,0001	0,995
490	5451	5551	0,0001	0,995
489	464	4329	0,0001	0,995
488	684	NG529	0,0001	0,995
487	4241	4299	0,0001	0,995
486	2703	2749	0,0001	0,995
485	2768	5543	0,0001	0,994
484	2736	5589	0,0001	0,994
483	2764	4287	0,0001	0,994
482	4172	4319	0,0001	0,994
481	5388	5407	0,0001	0,994
480	5454	5458	0,0001	0,994
479	5495	5594	0,0001	0,994
478	5435	5498	0,0001	0,993
477	5377	5410	0,0001	0,993

* Valores em negrito indicam acessos em que os dados de passaporte não estão disponíveis.

Observa-se, entretanto, que nas 58 primeiras fusões consideradas, dezesseis acessos não possuem dados de passaporte; assim, a utilização de técnicas de biologia molecular poderá ser necessária para a confirmação ou não da duplicidade. Mesmo nos casos em que os dados de passaporte estão disponíveis, essas técnicas poderão ser muito úteis para se confirmar o grau de similaridade entre os acessos (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Souza, 2001; Ferreira et al., 2007)

Os acessos tomados como testemunhas, isto é, as cultivares Bandeirante e Mineirão, e CPAC 1371 e CPAC 4144 foram classificados, respectivamente, nos grupos 1, 10, 9 e 11. Isso confirma a relativa divergência entre estes acessos, já comentada anteriormente, também observada na dispersão gráfica dos acessos no primeiro plano da análise de componentes principais (Figura 3.1).

Nas análises de variância univariadas, verificou-se que houve efeito significativo de grupos, em nível de 1% de probabilidade, para todas as dezessete variáveis consideradas (Tabela 3.3). Esse resultado indica que a análise de agrupamento, uma técnica multivariada, foi capaz de discriminar os acessos em grupos de dissimilaridade, que ratificam as suas divergências mesmo quando as variáveis são analisadas de forma independente. Isso valoriza também a escolha e o descarte de variáveis feitos neste estudo, que implicaram em manter descritores importantes para a discriminação dos acessos avaliados. As médias dos grupos formados, bem como o resultado do teste de Tukey, comparando estas médias entre si, para cada variável, em nível de 5% de probabilidade, são apresentadas na Tabela 3.4.

Inicialmente, vale destacar que o Grupo 1, que inclui a cultivar Bandeirante, foi o que apresentou acessos mais tardios, o que coincide com uma das principais características dessa cultivar, pertencente à variedade *pauciflora*, também conhecida como “tipo tardio”. O grupo de outra testemunha, CPAC 1371, Grupo 9, tem como principais características o maior número de ramificações, embora muito curtas, e folíolos bastante lanceolados, sobretudo em condições de campo. O Grupo 11, com o acesso testemunha CPAC 4144, apresenta plantas com eixo e ramos curtos, de folíolos arredondados (tanto no campo como em casa de vegetação), tardias e com maior intervalo entre o início e o pleno florescimento (INT). Já o Grupo 10, que reúne a cultivar Mineirão, como já salientado, caracteriza-se por plantas de maior porte e com folíolos maiores, em relação às outras testemunhas.

Considerando-se que a espécie *S. guianensis* pode ser utilizada em diversos sistemas agrícolas, e não somente como produtora de forragem para a alimentação animal, e analisando-se as médias das variáveis nos grupos formados (Tabela 3.4), merecem atenção os acessos de cinco grupos potenciais (2, 3, 4, 7 e 10). O primeiro a ser ressaltado é o Grupo 3, formado por 18 acessos, que se destaca pelo maior porte das plantas. Foi o agrupamento que apresentou maior altura, comprimento do eixo, comprimento de ramos e diâmetro de planta. Acessos desse grupo também têm, em média, o início do florescimento ocorrendo entre a segunda quinzena de maio e a primeira quinzena de junho, e o pleno florescimento entre a segunda quinzena de junho e a primeira quinzena de julho, ou seja, são plantas de ciclo tardio. Plantas desse grupo também apresentaram maior tamanho de folíolos, em condições de campo. Assim, são acessos que devem ter alto potencial para produção de forragem e também, por se manterem mais tempo em fase vegetativa, podem ser potencialmente úteis para a alimentação animal e adubação verde. Porém, baixas produções de sementes poderão ocorrer e, portanto, essa característica deve ser muito bem avaliada antes de uma indicação comercial.

Tabela 3.3. Resultados da análise de variância univariada, para as dezessete variáveis morfoagronômicas, comparando-se os treze grupos de similaridade formados a partir de 535 acessos de *Stylosanthes guianensis*.

Variáveis ¹	Média	CV (%)	GL	SQ	Valor F	Significância
ALT	25,852	27,158	12	37237,620	62,950	**
EIXO	72,349	17,885	12	89410,718	44,500	**
NR	6,524	18,028	12	423,325	25,500	**
CPR	88,192	14,708	12	110882,733	54,920	**
LFC	6,321	16,740	12	916,244	68,180	**
CFC	22,224	16,366	12	8426,135	53,080	**
DP	131,274	16,256	12	326910,020	59,820	**
RCLC	3,624	17,340	12	124,171	26,210	**
RDA	5,915	32,469	12	2553,680	57,690	**
RRE	1,240	12,528	12	5,259	18,160	**
PCS	0,240	14,110	12	0,502	36,580	**
CFC1	39,262	13,663	12	13801,089	39,970	**
LFC1	7,080	19,533	12	2343,363	102,090	**
RCLC1	6,052	18,154	12	1155,791	79,790	**
IF	4,297	25,277	12	1481,863	104,660	**
PF	6,217	17,935	12	1261,919	84,590	**
INT	1,920	37,241	12	184,765	30,130	**

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

¹ ALT: altura; EIXO: comprimento do eixo; NR: número de ramos primários; CPR: comprimento do primeiro ramo; LFC e CFC: largura e comprimento do folíolo central; LFL e CFL: largura e comprimento do folíolo lateral; DP: diâmetro da planta; RCLC: CFC/LFC; RCLL: CFL/LFL; RDA: DP/ALT; RRE: CPR/EIXO; PCS: peso de 100 sementes; IF: início do florescimento; PF: florescimento pleno; INT: intervalo entre o início e pleno florescimento; o número 1 nesses rótulos indica medidas tomadas em casa de vegetação.

Tabela 3.4. Médias¹ de dezessete variáveis morfoagronômicas em treze grupos de similaridade, formados a partir de análise de agrupamento pelo método de Ward, aplicada a uma coleção de 535 acessos de *Stylosanthes guianensis*.

Variável ²	Grupo1	Grupo2	Grupo3	Grupo4	Grupo5	Grupo6	Grupo7	Grupo8	Grupo9	Grupo10	Grupo11	Grupo12	Grupo13	Média
ALT	30,31 c	40,76 ab	39,15 b	45,51 a	27,05 c	17,14 e	7,48 f	19,38 de	17,91 e	26,51 c	26,36 c	28,39 c	24,63 cd	25,85
EIXO	70,1 cde	85,3 b	115,2 a	72,1 cd	70,4 cd	59,2 f	65,5 def	78,6 bc	56,2 f	84,5 b	59,9 ef	84,9 b	64,5 def	72,3
NR	6,45 cd	6,29 cd	6,24 cde	5,10 f	5,32 ef	6,16 cde	6,47 cd	5,70 def	8,68 a	6,34 cd	7,44 b	7,05 bc	6,88 bc	6,52
CPR	89,6 def	115,6 b	129,4 a	71,3 h	82,2 efg	74,7 gh	74,6 gh	92,0 cde	70,4 h	101,3 c	86,8 def	96,3 cd	80,8 fgh	88,2
LFC	5,49 e	6,71 cd	9,39 a	6,36 d	7,02 bcd	5,06 ef	4,78 ef	5,08 ef	4,41 f	8,54 a	7,61 b	7,42 bc	6,62 cd	6,32
CFC	21,59 cde	28,31 b	33,66 a	28,36 b	19,88 def	18,22 fg	16,68 g	19,00 efg	19,17 efg	27,66 b	22,98 c	22,91 c	22,40 cd	22,22
DP	139,8 c	165,1 b	209,9 a	119,3 def	112,6 ef	102,7 f	114,8 ef	129,2 cde	111,2 f	170,9 b	146,3 c	135,5 cd	117,0 ef	131,3
RCLC	4,00 abc	4,23 abc	3,70 cd	4,49 a	2,85 f	3,63 cde	3,50 cde	3,75 bcd	4,46 a	3,26 def	3,15 ef	3,16 ef	3,46 de	3,62
RDA	4,81 ef	4,19 fg	5,83 cde	2,69 g	4,45 ef	6,40 bcd	16,08 a	7,47 b	6,75 bc	7,04 bc	5,80 cde	5,05 def	4,97 def	5,92
RRE	1,29 bc	1,38 ab	1,15 de	0,99 f	1,19 cde	1,28 bc	1,14 e	1,18 cde	1,27 bcd	1,21 cde	1,47 a	1,14 e	1,27 bcd	1,24
PCS	0,25 cd	0,21 f	0,28 b	0,37 a	0,22 f	0,24 cde	0,24 cde	0,24 cdef	0,22 f	0,26 bc	0,22 f	0,23 def	0,24 cdef	0,24
CFC1	36,53 efg	47,48 ab	48,55 ab	51,29 a	41,60 cd	34,42 gh	30,96 h	39,15 def	33,25 gh	44,97 bc	34,87 fgh	39,27 de	39,09 def	39,26
LFC1	5,11 e	8,78 b	8,47 bcd	5,42 e	11,21 a	4,97 e	4,41 e	4,95 e	5,34 e	9,36 b	7,40 d	8,71 bc	7,60 cd	7,08
RCLC1	7,28 bc	5,54 ef	6,05 de	9,81 a	3,75 h	6,98 c	7,10 c	8,02 b	6,51 cd	4,92 fg	4,85 fg	4,64 g	5,27 efg	6,05
IF	6,91 a	2,53 f	5,22 c	3,85 de	1,56 g	6,25 ab	6,47 a	5,17 c	4,20 d	5,48 bc	4,26 d	3,10 ef	2,56 f	4,30
PF	8,11 a	4,45 e	7,50 ab	7,20 bc	3,29 f	7,53 ab	7,76 ab	7,15 bc	6,42 c	6,90 bc	7,41 ab	5,52 d	4,20 e	6,22
INT	1,20 f	1,93 bcde	2,28 bc	3,35 a	1,73 cdef	1,28 f	1,29 f	1,98 bcde	2,22 bcd	1,42 ef	3,15 a	2,42 b	1,65 def	1,92
N	44	40	18	20	48	68	17	54	45	31	34	62	54	535

¹ Médias seguidas de letras iguais, na mesma linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

² ALT: altura (cm); EIXO: comprimento do eixo (cm); NR: número de ramos primários; CPR: comprimento do primeiro ramo (cm); LFC e CFC: largura e comprimento do folíolo central (mm); LFL e CFL: largura e comprimento do folíolo lateral (mm); DP: diâmetro da planta (mm); RCLC: CFC/LFC; RCLL: CFL/LFL; RDA: DP/ALT; RRE: CPR/EIXO; PCS: peso de 100 sementes (g); IF: início do florescimento; PF: florescimento pleno; INT: intervalo entre o início e pleno florescimento; o número 1 nesses rótulos indica medidas tomadas em casa de vegetação.

Outro grupo que deve ter seus acessos testados para os sistemas de produção animal e de adubação verde é o Grupo 2. Com 40 acessos, esse grupo caracterizou-se por apresentar plantas de maior porte, porém mais precoces do que as do Grupo 3, pois tem início do florescimento no mês de abril e o pleno florescimento ocorre, em média, no mês de maio. Nota-se, entretanto, que o peso de cem sementes (PCS) nesse grupo de acessos é o mais baixo entre todos os grupos formados. Essa característica pode estar correlacionada com o vigor da planta na fase de estabelecimento, o que também requer atenção especial numa possível indicação varietal.

O grupo que inclui a cultivar Mineirão, Grupo 10, possui acessos com característica de porte da planta semelhantes aos dos dois grupos anteriores e devem ser avaliados para os mesmos sistemas agrícolas. São plantas mais prostradas, com a relação diâmetro/altura (RDA) de 7,04, e com intervalo entre o início e o pleno florescimento (INT) inferior a um mês. O intervalo em que a planta permanece em florescimento está correlacionado com o sincronismo do florescimento (Souza, 1981), e longos períodos de florescimento podem facilitar a hibridação artificial no processo de melhoramento genético. Porém, essa característica não é desejável em uma cultivar, pois como as sementes são deiscuentes nesta espécie vegetal, buscam-se materiais com maior sincronismo, para se evitar perdas nas colheitas (Andrade, 2001).

Nota-se que os três grupos discutidos (2, 3 e 10) mostram-se bastante próximos entre si (Figuras 3.1 e 3.3), de modo que poderiam ser reunidos em um só grupo, se a partição fosse truncada em menos de seis grupos. Porém, nesse caso, as diferenças acerca das características do florescimento e do peso das sementes não seriam detectadas.

Os dezessete acessos reunidos no Grupo 7, alternativamente, poderiam ser avaliados como plantas para cobertura verde, haja vista apresentarem-se bastante prostradas, com a menor altura e a maior relação diâmetro/altura (RDA) dentre todos os grupos. São plantas com folíolos menores e de pequeno diâmetro. Em uma situação de uso, o menor diâmetro poderia ser compensado com uma maior densidade de plantas. Entretanto, esses acessos são tardios e devem ser mais bem avaliados quanto à produção de sementes. Por outro lado, apresentam maior sincronismo do florescimento, o que é vantajoso do ponto de vista do desenvolvimento de cultivares.

Atualmente, há tendência crescente de demanda por leguminosas forrageiras que possam ser utilizadas em sistemas de integração lavoura-pecuária, tendo em vista o crescimento da adoção dessa tecnologia pelos produtores (Vilela et al., 2003). Essa é uma

situação nova para os melhoristas de plantas, pois, embora as plantas mais adequadas para esse sistema devam ser boas produtoras de forragem, terem rápido crescimento inicial e não sofrerem com a competição da lavoura e/ou da gramínea associada, ao mesmo tempo, não devem exercer competição significativa sobre a produção da lavoura nem representarem fontes de pragas e/ou doenças para a cultura acompanhante (Vilela et al., 2003; Karia, 2007). Assim, plantas mais eretas, que suportem a competição por luz e com maior peso de sementes, de modo a apresentar maior vigor de estabelecimento, talvez possam ser utilizadas para esse tipo de sistema. Nesse aspecto, os acessos do Grupo 4 revelam potencial e poderiam ser testados, pois são plantas bastante eretas, com menor relação diâmetro/altura (RDA) e constituem o único grupo cujas plantas têm a primeira ramificação primária, em média, inferior ao comprimento do eixo (RRE igual a 0,99). Também apresentam o maior peso médio de sementes e os folíolos mais lanceolados, tanto em casa de vegetação como em condições de campo, RCLC1 e RLC de 9,81 e 4,49, respectivamente.

Observa-se que essa descrição fenotípica dos grupos coincide com a representação gráfica dos acessos e com o círculo de correlações dos vetores das variáveis, tomados em relação aos dois primeiros componentes principais (Figura 3.1). Nesta representação, os acessos dos Grupos 2, 3 e 10 estão localizados no quadrante superior direito, diretamente correlacionados com o maior porte de plantas. O Grupo 4, representado na região central superior, está correlacionado com valores altos das variáveis PCS e RCLC (relacionadas ao segundo componente principal) isto é, elevado peso médio de sementes e formato lanceolado do folíolo. O Grupo 7, representado no extremo esquerdo do gráfico, está diretamente correlacionado com maior RDA e IF (relacionadas ao primeiro componente principal), indicando plantas prostradas e com florescimento tardio; porém, inversamente correlacionado com LFC e LFC1 (também associadas ao primeiro componente principal), indicando plantas com menor largura do folíolo central. Nota-se também, que o Grupo 5 é inversamente correlacionado com IF e PF, indicando ser constituído de acessos precoces, o que é confirmado pelos resultados mostrados na Tabela 3.4. Esse grupo é o mais precoce entre todos, e possui baixo valor médio para o intervalo entre o início e o pleno florescimento (INT). Isso pode ser interessante para o objetivo de produção de sementes.

Em síntese, considerando-se as características fenotípicas dos cinco grupos identificados como de maior potencial agrônômico, seria interessante, então, submeter os

89 acessos, que compõem os Grupos 2, 3 e 10, a avaliações em sistemas de produção de forragem, adubação verde ou outro sistema em que a produção de biomassa seja importante. Os 17 acessos do Grupo 7, por sua vez, devem ser avaliados como plantas de cobertura, nas entrelinhas das culturas perenes, taludes e bordas de rodovias, com o objetivo de proteção do solo. Por fim, os 20 acessos do Grupo 4 poderiam ser testados em sistemas de integração lavoura-pecuária.

É importante reiterar que os acessos destes cinco grupos, embora demonstrem maiores chances de aproveitamento, devem ser submetidos aos testes agrônômicos específicos, sob bom controle ambiental, antes de qualquer indicação definitiva (Valls, 1988; Hidalgo, 2003). O presente trabalho, portanto, traz uma contribuição no sentido de reduzir o número de acessos a serem avaliados nesses testes, a fim de se ganhar eficiência e eficácia nessas avaliações, bem como estimular pesquisas adicionais com os acessos remanescentes do banco de germoplasma. Assim, é possível uma redução do número de acessos a serem avaliados para uso potencial em sistemas agrícolas, de 535 para 126 (89 + 17 + 20), o que representa uma economia considerável, que pode ser revertida na melhoria da eficiência e da eficácia das avaliações experimentais desses recursos genéticos.

Cabe ressaltar também que, com os resultados dessa caracterização, outros estudos podem ser realizados, utilizando-se outras ferramentas estatísticas e técnicas de observação em nível de DNA (Ferreira, 2007), para se explorar novos objetivos e garantir maior acurácia na identificação dos grupos de similaridade dos acessos. Como exemplos, podem ser citados: estabelecimento de novas coleções de trabalho; agregação dos dados de passaporte para indicar *hot spots* de variabilidade fenotípica (Barros, et al., 2005); estimação de correlações entre distâncias fenotípicas e geográficas (Telles et al., 2001); agregação de informações geográficas e ambientais dos locais de coleta, com a identificação de fatores que mais contribuem para a variabilidade fenotípica observada, fornecendo, inclusive, indicações de regiões para novas coletas (Telles et al., 2001; Melo et al., 2002); e agregação de outros dados, como os de caracterização genético-molecular (Ferreira et al., 2007), que poderiam ser úteis, tanto para auferir confiabilidade adicional a este estudo, como para o estabelecimento de uma robusta coleção nuclear (Cordeiro & Abadie, 2007).

3.4 CONCLUSÕES

- i)* A variabilidade fenotípica existente na coleção é bastante ampla, considerando-se o conhecimento sobre as testemunhas utilizadas e os acessos comuns estudados em outras avaliações morfoagronômicas.
- ii)* Os primeiros passos do algoritmo de agrupamento pelo método de Ward permitiram identificar que 53 conjuntos de acessos são muito similares fenotipicamente, os quais devem ser investigados quanto à possibilidade de serem geneticamente idênticos (duplicatas).
- iii)* Cinco grupos, correspondendo a 126 acessos, têm potencial agrônomo para serem utilizados em sistemas de produção de forragem e adubação verde ou como planta de cobertura ou em sistemas de integração lavoura-pecuária, devendo ser avaliados de forma mais detalhada, em experimentos específicos.
- iv)* Existem, na coleção, acessos com maior potencial agrônomo do que a cultivar Mineirão, atual paradigma de produção de forragem em *Stylosanthes*, para a utilização na alimentação animal e na adubação verde e que devem ser selecionados para avaliação agrônoma mais detalhada.

4 VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes guianensis* UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

RESUMO

A falta de informação é uma das principais causas do baixo nível de utilização dos recursos genéticos mantidos *ex situ*, nos bancos de germoplasma. A caracterização e avaliação das introduções são fundamentais para subsidiar decisões sobre o manejo desses bancos e, também, para selecionar materiais com potencial agrônomo, com vistas à sua utilização direta ou em programas de melhoramento genético de plantas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar 437 acessos da leguminosa *Stylosanthes guianensis*, mantidos no banco de germoplasma da Embrapa, utilizando marcadores microssatélites (SSR). Foram utilizados sete *primers*, marcados com fluorescência. A detecção dos fragmentos de DNA gerados por PCR foi feita por meio de eletroforese capilar, em um analisador automático de fragmentos, modelo ABI PRISM 3100 – Applied Biosystems. Realizou-se a extração do DNA usando-se um *bulk* de tecidos de quatro plantas por acesso e as frequências dos alelos, em cada acesso, foram estimadas pelas alturas relativas dos picos de fluorescência. Por meio das frequências alélicas, gerou-se uma matriz de dissimilaridade, utilizando-se a distância genética de Rogers modificada por Wright (1978). Essa matriz foi empregada para a análise de agrupamento dos acessos, pelo método UPGMA, e para a análise de coordenadas principais. A matriz de distâncias genéticas também foi comparada com a matriz de distâncias euclidianas, obtida a partir de avaliação morfoagronômica dos acessos, pelo teste Z de Mantel. A significância da correlação foi estimada por 10 mil permutações aleatórias. Os sete *primers* produziram 45 alelos (6,43 alelos/loco), dos quais quatro foram alelos privados a acessos específicos. Detectaram-se 159 acessos com algum nível de polimorfismo, indicando que nesses acessos existem plantas heterozigóticas e, ou, que estes acessos são constituídos por misturas de linhagens puras (espécie preferencialmente autógama). Observou-se tendência dos acessos se agruparem por variedades botânicas, tanto na análise pelo método UPGMA, quanto na análise de coordenadas principais, exceto para a variedade *microcephala*. Entre os acessos dessa variedade botânica, observou-se tendência de estruturação genética, que pode estar relacionada com a sua adaptação a solos de maior fertilidade. Foram identificados 58 conjuntos de acessos geneticamente idênticos, os quais devem ser investigados com maior rigor quanto à possibilidade de representarem duplicidades. A correlação entre as dissimilaridades genéticas e morfoagronômicas foram altamente significativas, porém, de baixa magnitude ($r = 0,23$; $P \leq 0,0001$), indicando que ambas as avaliações são importantes e devem ser realizadas para a caracterização de acessos da espécie. Considerando-se os acessos com potencial agrônomo, selecionados a partir da avaliação morfoagronômica, identificaram-se acessos bastante dissimilares geneticamente da cultivar Mineirão, o atual padrão comercial no Brasil. Esses acessos devem ser avaliados agronomicamente, para compor possíveis cruzamentos com a cultivar comercial, a fim de se atestar a existência de correlações positivas entre a variância de progênies nos caracteres de interesse e a dissimilaridade genética. Caso a correlação exista, a seleção *a priori* de genitores pela divergência genética, estimada por marcadores SSR, poderá ser ótima ferramenta a ser empregada no melhoramento genético da espécie, haja vista a dificuldade do processo de hibridação artificial.

Palavras-chave: recursos genéticos, germoplasma, leguminosa tropical, forrageira.

ABSTRACT

GENETIC VARIABILITY OF *Stylosanthes guianensis* ACCESSIONS
USING MICROSATELLITE MARKERS

The lack of basic information is one of the main reasons for the low utilization of genetic resources maintained *ex-situ* in germplasm banks. Characterization and evaluation of the genetic resources are critical to support decisions regarding the management of these germplasm banks, and also to select materials with agronomic potential, that allows their direct use or its incorporation into plant breeding programs. The goal of this research was to characterize 437 germplasm accessions of the tropical legume *Stylosanthes guianensis*, stored at germplasm bank of Embrapa, using SSR molecular markers. Seven primers, marked with fluorescence were used, and the detection of the DNA fragments generated by PCR was accomplished by a capillary electrophoresis, in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer – Applied Biosystems. A bulk DNA sample, attained from four plants of each accession was used in this process, and the allele frequency was estimated by the relative height of the fluorescence peak. The allele frequencies were used to generate a matrix of dissimilarity, using the genetic distance of Rogers modified by Wriqth (1978). This matrix was used to perform a cluster analysis, using the UPGMA method, and a principal coordinates analysis (PCO). The genetic distances matrix was also compared to the Euclidian distances matrix obtained from the morpho-agronomic evaluation of the accessions, using Mantel's test. The statistical significance of the correlation was estimated in ten thousand random permutations. The seven primers generated 45 alleles (6.43 allele/locus), of which four were private alleles in specific accessions. Some level of polymorphism was detected within accessions in 159 samples, indicating that in DNA pool of these accessions there are heterozygous plants, and/or, each accession is a mixture of inbred lines (predominantly self-pollinated species). A tendency of the botanical varieties accessions grouping together was observed, in both analysis (PCO and UPGMA method), with the exception of *microcephala* botanical variety. It was observed a tendency for genetic structuration among accessions of this botanical variety, which may be related to its adaptation to the soils with better fertility. The UPGMA analysis identified 58 clusters with genetically identical accessions. Further investigation should be required to confirm if such accessions are same identicals and, actually, represent duplications. The correlation between the genetic and morpho-agronomic dissimilarities was highly significant, however, it was of low magnitude ($r = 0.23$, $P \leq 0.0001$). This indicates that both evaluations are important and should be performed to achieve a more complete genetic characterization of the accessions of this species. Considering the germplasm accessions with agronomic potential, selected based on the morpho-agronomic evaluation, several of them presented great genetic dissimilarity to the cultivar Mineirão, a check commercial cultivar. These accessions should be tested for agronomic traits, and crossed with the commercial cultivar to generate offspring, in order, to certify the existence of positive correlations between variance of progenies in the interesting traits and genetic dissimilarity. If this correlation exists, the selection of parents based on the genetic divergence estimated by SSR markers can be used as an efficient tool to be employed in the breeding programs of this species.

Key words: genetic resources, germplasm, tropical legume, forage.

4.1 INTRODUÇÃO

Espécies de *Stylosanthes* são amplamente distribuídas pelo continente americano, especialmente na região do Cerrado brasileiro, centro de diversidade do gênero. Das 49 espécies reconhecidas, 29 ocorrem no Brasil e destas, treze foram encontradas somente em território brasileiro (Costa, 2006). Essas leguminosas são bastante utilizadas como alimento para animais, adubo verde e como planta de cobertura para a proteção do solo em culturas perenes, taludes e em bordas de rodovias, principalmente na Austrália, China, Índia, Indonésia, Filipinas, Malásia e Tailândia (Cameron & Chakraborty, 2004).

Na América Tropical o emprego de leguminosas nesses sistemas ainda é incipiente, sobretudo na alimentação animal, considerando-se as grandes áreas que são ocupadas por pastagens e o tamanho do rebanho bovino no Brasil (Spain, 1988; Andrade et al., 2004). Por outro lado, existem milhares de acessos de leguminosas tropicais armazenados *ex situ* nos bancos de germoplasma brasileiros. Somente na Embrapa Cerrados estão registrados mais de cinco mil acessos de leguminosas tropicais com potencial forrageiro, dos quais mais de 1.500 pertencem ao gênero *Stylosanthes* (Karia & Andrade, 1996).

A espécie *S. guianensis*, diplóide e preferencialmente autógama (Stace, 1984), está dividida em quatro variedades botânicas: *guianensis*, *pauciflora*, *canescens* e *microcephala* (Costa, 2006). Possui grande potencial de utilização em sistemas agrícolas, pois apresenta genótipos com elevada capacidade de produção de forragem, tolerância a solos ácidos e de baixa fertilidade natural, tolerância à seca, resistência a pragas e doenças, além de ser fixadora de nitrogênio, sem a necessidade de inoculação com estirpes específicas de rizóbio, nas condições da região do Cerrado (Embrapa Cerrados, 1998; Andrade et al., 2004).

De modo geral, os recursos genéticos armazenados *ex situ* são pouco utilizados nos sistemas de produção e no melhoramento genético de plantas. Um dos principais motivos pelo uso incipiente desses recursos é a dificuldade de se obterem as informações de interesse acerca dos acessos armazenados, seja por insuficiência dos dados de passaporte ou pela falta de caracterização em nível morfológico, fisiológico, agrônomico, ecológico ou genético-molecular (Peeters & Williams, 1984; van Sloten, 1987; Humphreys, 2003).

A caracterização molecular é uma ferramenta bastante interessante para a avaliação da diversidade genética de coleções de germoplasma, pois os marcadores moleculares podem ser obtidos em grande número, possuem baixo custo por informação obtida, apresentam comportamento mendeliano, são distribuídos por todo o genoma, são neutros e não sofrem efeito ambiental (Ferreira et al., 2007). Apesar dessas vantagens, a avaliação agrônômica é sempre necessária para promover a utilização dos recursos armazenados, pois para o melhorista de plantas, a expressão fenotípica das características de interesse agrônômico possui fundamental importância (Idris & Saad, 2001; Nass, 2001; Hidalgo, 2003).

A caracterização genético-molecular, em conjunto com dados de outra natureza, permite, ainda, avaliar e subsidiar a tomada de decisões nos processos de coleta, manutenção, manejo e intercâmbio de acessos, em bancos de germoplasma, além de ajudar os melhoristas na escolha de genitores a serem utilizados em programas de melhoramento genético das espécies envolvidas (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Souza, 2001; Ferreira et al., 2007).

Dada a tendência de redução nos custos com reagentes e equipamentos, a rapidez na obtenção de resultados e o desenvolvimento de novas técnicas, os marcadores moleculares são cada vez mais utilizados para caracterização de coleções de germoplasma, mesmo para aquelas em que o número de acessos é grande (Ferreira et al., 2007). Em forrageiras tropicais, esse tipo de marcador já foi utilizado para caracterizar, por exemplo, 284 acessos da leguminosa americana *Desmanthus* spp., utilizando-se marcadores RAPD (Pengelly & Liu, 2001); 467 acessos de milho, utilizando-se microssatélites (Mariac et al., 2006); 95 acessos de *Paspalum notatum*, utilizando-se ISSR (Cidade et al., 2008); 87 acessos de *Stylosanthes macrocephala*, utilizando-se RAPD (Barros et al., 2005); 35 acessos de *S. guianensis*, utilizando-se RAPD (Faleiro et al., 2004); e 42 acessos de *S. guianensis*, utilizando-se marcadores AFLP (Jiang et al., 2005).

Os microssatélites são marcadores, em geral, co-dominantes, ou seja, todos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados, além de serem multialélicos e bastante estáveis. Apesar das vantagens desse tipo de marcador, o seu uso ainda é restrito a poucas espécies, pois o desenvolvimento dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) é um processo muito trabalhoso, caro, que exige pessoal especializado e equipamentos sofisticados (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Souza, 2001).

Para *S. guianensis* estão disponíveis dezoito seqüências de *primers*, desenvolvidos por Vander Stappen et al. (1999a). Esses oligonucleotídeos foram gerados utilizando-se 65 acessos de *S. guianensis* ssp. *guianensis*, identificados segundo a classificação de Mohlenbrock (1958). De acordo com a classificação de Costa (2006), *S. guianensis* ssp. *guianensis* envolve mais sete espécies, além de *S. guianensis*. Essas espécies geraram polimorfismo com média de 3,7 alelos por loco, e onze dos marcadores utilizados demonstraram conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) acima de 0,45. Segundo Vander Stappen et al. (1999a), este é um valor considerado como muito bom para a genotipagem de acessos em bancos de germoplasma.

Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar os acessos da coleção de *S. guianensis* da Embrapa, utilizando-se os marcadores microssatélites desenvolvidos por Vander Stappen et al. (1999a), e, a partir disso, verificar a existência de estruturação genética na coleção, identificar possíveis duplicatas entre os acessos e verificar a existência de correlações entre as diversidades morfológica e molecular observadas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, foram utilizados 480 acessos de *S. guianensis*, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Forrageiras da Embrapa Cerrados e da Coleção de Base da Embrapa. Os acessos avaliados foram coletados na Colômbia, Venezuela e, no Brasil, nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Tocantins, Bahia, Pernambuco, Alagoas, Paraíba, Ceará, Piauí, Maranhão e Pará.

As plantas foram estabelecidas no ano de 2006, em condições de casa de vegetação, na área experimental da Embrapa Cerrados, em Planaltina, Distrito Federal (15°36'05'' de latitude sul, 47°42'32'' de longitude oeste e 990 m de altitude). As sementes foram escarificadas mecanicamente, utilizando-se lixa d'água nº 180, e colocadas em caixas do tipo Gerbox, de acrílico transparente, forradas com duas folhas de papel de filtro, para germinação. Antes de receberem as sementes, as caixas foram lavadas com água e sabão, e mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio. Após a germinação das sementes, quando o comprimento total das plântulas atingiu aproximadamente 2,0 cm, foi realizado o transplântio em bandejas para mudas, perfuradas com 72 células (6 x 12), que

foram mantidas em casa de vegetação. Cada linha de seis plantas correspondia a um acesso.

Após, aproximadamente, setenta dias em casa de vegetação, amostras de folíolos de quatro plantas do mesmo acesso foram obtidas para a extração de DNA. Quatro folíolos de largura semelhante foram colhidos, um de cada planta amostrada, os quais foram empilhados e, com o uso de uma tesoura, recortou-se, da região central, aproximadamente 0,5 cm de comprimento do tecido foliar. Essa mistura de tecidos das plantas foi imediatamente colocada em microtubos do tipo *eppendorf* de 2 mL e mantidos em gelo.

O método de extração de DNA utilizado foi o de CTAB simplificado, ajustado para *S. guianensis* e outras espécies vegetais, conforme descrito por Bellon et al. (2007). O tecido vegetal fresco foi macerado com o auxílio de uma barra de vidro e, em seguida, foram adicionados, em cada amostra, 400 μ L de tampão constituído por Tris HCl 100 mM, pH 8,0, CTAB 2%, EDTA 20mM e NaCl 1,4 M. As amostras foram colocadas em banho-maria a 65°C, por vinte minutos. A desproteínização foi feita adicionando-se 400 μ L de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitando-se até a formação de uma emulsão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por cinco minutos e, aproximadamente, 200 μ L do sobrenadante foi retirado e colocado em novo tubo autoclavado (2 mL). No novo tubo, ao sobrenadante adicionaram-se 200 μ L de isopropanol gelado, agitando-se, em seguida, para promover a precipitação do DNA. Os tubos foram centrifugados a 7.000 rpm por dez minutos e, então, foi descartado o sobrenadante. O *pellet* formado após a centrifugação foi lavado com 200 μ L de etanol a 70%, e seco à temperatura ambiente. Após completamente seco, o *pellet* foi ressuscitado em 50 μ L de água, contendo RNase na concentração de 40 μ g/mL.

A quantidade de DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (A_{260}) e a relação A_{260}/A_{280} foi utilizada para avaliar a sua pureza (Sambrook et al., 1989). Bandas de DNA, separadas por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) e coradas com brometo de etídeo, foram usadas como indicadoras da integridade do material extraído. O *pool* de DNA de quatro plantas foi diluído para a concentração de 2,5 ng/ μ L e as amostras foram levadas ao Laboratório de Genética e Genômica de Plantas, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia, onde as análises moleculares foram realizadas.

Inicialmente, os 18 pares de *primers* desenvolvidos por Vander Stappen et al. (1999a) foram testados para os ajustes nas reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), verificação de polimorfismo de alelos e possibilidade de se estabelecerem sistemas *multiplex*. Para esses testes, foram utilizados DNA de 16 acessos, selecionados pela divergência morfológica e pela maior distância entre os locais de coleta. As reações iniciais de amplificação foram feitas utilizando-se 10 ng de DNA, 0,25 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 μM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 2,0 unidades de Taq DNA polimerase e 2,5 μL de tampão 10 X (10 mM Tris-HCL, pH 8,3, 50 mM de KCl), para um volume final de 25 μL. A reação de PCR consistiu em uma prévia desnaturação por quatro minutos a 94°C, seguida por trinta ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por um minuto, 72°C por um minuto e um último passo, para extensão, a 72°C por cinco minutos. A verificação de polimorfismo e a qualidade da amplificação foi feita em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM) e visualizados sob luz ultravioleta. A confirmação do polimorfismo dos fragmentos amplificados foi feita em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% (p/v), em corrida com 1X TBE, corado com nitrato de prata. O tamanho dos alelos foi estimado por comparação com DNA *ladder* padrão de 50 pb (Gibco).

Os oligonucleotídeos selecionados foram sintetizados novamente, porém, com a seqüência *forward* marcada com fluorocromo específico (6-FAM ou HEX), de forma a possibilitar a montagem de painéis *multiplex*. As reações de amplificação, com os marcadores fluorescentes, foram feitas em termociclador Applied Biosystems, modelo GeneAmp PCR System 9700, para o volume final de 10 μL, contendo 5 ng de DNA, 0,25 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 μM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1,0 unidade de Taq DNA polimerase, e 1,0 μL de tampão 10 X (10 mM Tris-HCL, pH 8,3, 50 mM de KCl) (Vander Stappen et al., 1998). A reação de PCR foi a mesma utilizada na fase de testes, porém, com as temperaturas de anelamento otimizadas para cada sistema, variando de 47°C a 51°C.

Em seguida, 3,0 μL do produto de PCR foi colocado em microplaca de 96 poços, contendo 6,8 μL de formamida HiDi e 0,2 μL do marcador interno fluorescente GeneScan 500 ROX Size Standard, ambos da Applied Biosystems, totalizando 10 μL por poço. Após três minutos de agitação em *vortex*, essa mistura foi submetida à desnaturação por cinco minutos, a 95°C, seguida de resfriamento imediato em gelo, por três minutos. A eletroforese em capilar, para a detecção dos fragmentos SSR fluorescentes, foi realizada no

analisador automático de fragmentos ABI PRISM 3100 – Applied Biosystems, utilizando-se um capilar de 36 cm de comprimento. O programa computacional GeneMapper foi utilizado para a detecção automática do tamanho dos fragmentos e da intensidade dos picos de fluorescência. Conforme indicação do fabricante do GeneScan 500 ROX Size Standard, o marcador de tamanho 250 pares de base não foi considerado para as estimativas do tamanho dos fragmentos amplificados.

Para cada loco foram estimados o número de alelos (A) e a heterozigosidade esperada (H_e). Considerando-se que a heterozigosidade máxima possível é função do número médio de alelos por loco (A) e é dada por $H_{max} = 1 - (1/A)$, foram ainda estimadas as heterozigosidades esperadas relativas às máximas possíveis ($H_{e_{rel}}$).

As frequências alélicas dentro dos acessos foram estimadas pelas intensidades relativas de fluorescência, medidas pelas alturas dos picos correspondentes, considerando-se a intensidade como diretamente proporcional à frequência alélica no *pool* de DNA (Daniels et al., 1998). Com os dados das frequências alélicas, foram estimadas as distâncias genéticas entre os acessos, pela expressão de Rogers modificada por Wright (1978). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para a construção de um dendrograma, usando-se o método de agrupamento aglomerativo pela média não ponderada das distâncias (*average linkage* ou UPGMA) e, também, para a análise de coordenadas principais, com vistas à representação gráfica da dispersão dos acessos.

A consistência do dendrograma foi avaliada pela correlação cofenética entre as distâncias representadas pelo dendrograma e as distâncias genéticas originais entre os pares de acessos. A significância dessa correlação foi testada pelo teste Z de Mantel, utilizando-se 10 mil permutações aleatórias. Esse teste compara duas matrizes entre si, elemento por elemento, fornecendo um valor de correlação (r) que quantifica o grau de relacionamento entre as matrizes, o qual é testado por meio de permutações (Mantel, 1967).

Para a comparação entre as medidas de divergências genética e morfológica foi utilizada a matriz de distâncias euclidianas, estimada a partir dos dados standardizados das caracterização morfoagronômica dos acessos (capítulo 3). A matriz de distâncias morfológicas, tomada apenas para os acessos comuns nas duas avaliações, foi comparada com a matriz de distâncias genéticas, estimada a partir dos dados moleculares, utilizando-se também o teste Z de Mantel, com 10 mil permutações aleatórias. Todas essas análises foram feitas utilizando-se o programa NTSYS-pc v. 2.10 (Rohlf, 2000).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA pelo método CTAB simplificado e ajustado por Bellon et al. (2007) permitiu a obtenção de 8.789 ng de DNA, em média, com valor máximo e mínimo, respectivamente, de 50.000 ng e 2.000 ng. Considerando-se a utilização de 5 ng por reação de PCR, as quantidades obtidas seriam suficientes para, em média, mais de 1.700 reações e, no mínimo, 400 reações de PCR. Essas quantidades atenderam plenamente as necessidades da caracterização dos acessos do banco de germoplasma, levando-se em conta o número de locos investigados e os sistemas *multiplex* desenvolvidos. A relação A_{260}/A_{280} média e o desvio padrão foram de $1,53 \pm 0,19$, indicando boa pureza do DNA extraído.

Dos 18 *primers* testados inicialmente, três (SSR4-1, SSR4-5 e SSR1-3) não apresentaram produtos de amplificação ou resultaram em bandas muito fracas e com muitas falhas, mesmo com várias modificações na temperatura de anelamento e nas concentrações de reagentes (DNA, Taq DNA polimerase e *primer*). Dois apresentaram inespecificidade na amplificação (SSR1-2a e SSR3-70), mesmo com o aumento da temperatura de anelamento na reação de PCR. Assim, 13 oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram selecionados e sintetizados com a combinação de dois fluorocromos, 6-FAM (azul) e HEX (verde), para a montagem dos sistemas *multiplex* (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Conjuntos *multiplex* estabelecidos com 13 *primers* desenvolvidos por Vander Stappen (1999a) e as respectivas faixas de tamanhos de fragmentos gerados pela reação de PCR, descritos na literatura e obtidos em gel de poliacrilamida a 6% (p/v).

Sistema	Temperatura de anelamento (°C)	Loco	Fluorocromo	Faixa de tamanho dos fragmentos (pb)	
				Vander Stappen (1999a)	Teste com gel
Triplex-1	49	SSR1-2b	6-FAM	150-240	220-240
		SSR1-19	6-FAM	305-345	300-350
		SSR4-9	HEX	290-310	290-350
Triplex-2	49	SSR4-59	6-FAM	100-140	100-140
		SSR4-85	HEX	75-100	75-110
		SSR3-76	HEX	335-340	320-380
Duplex-1	49	SSR4-16b	6-FAM	150-220	180-240
		SSR4-51	HEX	190-300	200-260
Duplex-2	47	SSR1-9	6-FAM	90-115	80-120
		SSR4-55	HEX	250-265	220-280
Duplex-3	51	SSR4-16a	6-FAM	240-400	240-300
		SSR2-43	HEX	220-250	220-250
Single	46	SSR1-24	6-FAM	245-280	230-280

Na avaliação dos conjuntos *multiplex* montados, notou-se que os *primers* do sistema Triplex 2 produziram muitos picos “fantasmas” (*stutter peaks*), além de não demonstrarem especificidade no anelamento, apresentando múltiplos picos de fluorescência em uma mesma reação. Esse problema não foi percebido nos testes em gel de poliacrilamida a 6% (p/v), provavelmente porque a eletroforese em capilar permite maior precisão na determinação dos alelos, uma vez que se detecta o polimorfismo de comprimento entre fragmentos de até uma única base nitrogenada (Henegariu et al., 1997). Ademais, os *primers* do sistema Duplex 3 não produziram fragmentos de DNA na reação de amplificação, e o loco SSR4-9 do Triplex 1 apresentou muitas falhas e picos de fluorescência de baixa intensidade. Dessa forma, não foi possível considerar esses locos nas análises.

Com a utilização dos sete locos restantes, foram gerados 45 alelos (6,43 alelos/loco) (Tabela 4.2), valor superior aos 26 alelos (3,71 alelos/loco) encontrados por Vander Stappen et al. (1999a), para os mesmos locos. Apesar do maior número de acessos avaliados no presente trabalho, essa diferença não era esperada, haja vista a maior amplitude da variabilidade genética utilizada por Vander Stappen et al. (1999a) na identificação dos *primers*, com o uso das diferentes espécies do complexo *S. guianensis*. Por outro lado, Vander Stappen et al. (1999a) utilizaram gel de agarose a 5% para a visualização do polimorfismo, o que pode ter comprometido a detecção da variabilidade, quando a diferença no comprimento dos fragmentos era de poucos pares de bases.

Foram obtidos quatro alelos privados, nos locos SSR1-9 (107 pb), SSR1-24 (243 pb) e SSR4-16b (201 pb e 231 pb), os quais foram amplificados nos acessos CPAC 5572, CPAC 1365, CPAC 4142 e CPAC 5187, respectivamente, todos em homozigose.

Dos 480 acessos, foram considerados 437 para as análises, pois 43 acessos tiveram dados de três ou mais locos perdidos. Desses, 278 não demonstraram polimorfismo dentro de acesso, ou seja, as plantas do mesmo acesso apresentaram-se geneticamente idênticas entre si (possivelmente linhagens puras), e os demais, 159 acessos (36,4%), apresentaram algum polimorfismo dentro de acesso. Quando se utiliza um *bulk* de DNA de plantas na reação de PCR, os acessos com polimorfismo dentro também são chamados de “amostras heterozigóticas” (Li et al., 2008; Zang et al., 2008). Estas indicam que nesse *pool* de DNA há plantas heterozigóticas e, ou, que o acesso correspondente é uma mistura de linhagens puras. Das 159 “amostras heterozigóticas”, 109 acessos (68,6%) apresentaram variação em apenas um loco; 39 acessos (24,5%), em dois locos; dez acessos (6,3%), em

três locos; e apenas um acesso (0,6%) teve variação em quatro dos sete locos avaliados. Os locos SSR1-24 e SSR4-51 apresentaram as maiores frequências de “amostras heterozigóticas”, 14,98% e 13,54% dos acessos, respectivamente. Por outro lado, o loco SSR1-2b não detectou “heterozigozidade” dentro dos acessos (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Número de acessos (N), número de alelos (A), heterozigozidade esperada (H_e), heterozigozidade máxima possível (H_{max}), porcentagem da heterozigozidade esperada em relação à máxima possível ($H_{e_{rel}}$) e porcentagem de “amostras heterozigóticas” (P), numa coleção de 437 acessos de *Stylosanthes guianensis*, avaliados para sete locos microssatélites.

Loco	Fluorocromo	N	A	H_e	H_{max}	$H_{e_{rel}}$ (%)	P (%)
SSR1-2b	6-FAM	435	2	0,14	0,50	27,29	0,00
SSR1-9	HEX	424	8	0,78	0,88	88,91	8,96
SSR1-19	6-FAM	425	9	0,74	0,89	82,88	6,35
SSR1-24	6-FAM	414	8	0,29	0,88	32,81	14,98
SSR4-16b	6-FAM	336	9	0,54	0,89	61,24	8,33
SSR4-51	HEX	362	5	0,72	0,80	89,50	13,54
SSR4-55	HEX	305	4	0,71	0,75	95,20	5,57
Média	-	385,86	6,43	0,57	0,84	67,88	-

Brondani et al. (2006) avaliaram 176 acessos de variedades tradicionais de arroz e encontraram apenas 16 acessos (9,1%) com polimorfismo dentro do *bulk* de DNA de cinco plantas, utilizando-se 12 marcadores microssatélites, com detecção dos alelos em gel de poliacrilamida a 4% (p/v). Li et al. (2008) obtiveram frequência de 1,43% de “amostras heterozigóticas”, em *pool* de DNA de cinco plantas por acesso, em 1.863 raças locais de soja cultivada na China, utilizando-se 59 marcadores SSR. Zang et al. (2008) avaliaram 229 raças locais de feijão, também plantadas na China e introduzidas nos últimos quatrocentos anos, utilizando-se 30 marcadores SSR, e observaram frequência de “amostras heterozigóticas” inferior a 1%, em *bulk* de DNA de quatro plantas por acesso.

Essa discrepância nas frequências de “amostras heterozigóticas”, considerando-se as variedades tradicionais de arroz, soja e feijão anteriormente reportadas (inferiores a 10%) e os acessos de *S. guianensis* aqui estudados (36,4%), pode ser resultante das sucessivas autofecundações e do processo de seleção que as variedades tradicionais sofreram durante os anos de cultivos, e que levaram à uniformidade genética dentro dessas

populações cultivadas (Coelho & Valva, 2001). No caso de *S. guianensis*, os acessos são silvestres, oriundos de coletas em estado selvagem e, portanto, sem a interferência direta da seleção humana. Outro fator que poderia explicar o maior número de amostras com polimorfismo dentro desses acessos é a maior taxa de fecundação cruzada em *S. guianensis*, relativamente às espécies reportadas. Miles (1985) estimou essa taxa em 13,8%, na Colômbia, utilizando-se a cor da flor como marcador genético. Contrariamente, as taxas observadas nas referidas espécies cultivadas são: 0,5% a 1%, em soja (Sediyama et al., 1970; Verneti et al., 1972); 0% a 3%, em arroz (Taillebois & Guimarães, 1988; Silva et al., 2005); e 0,2% a 6%, em feijão (Pompeu, 1963; Pereira Filho & Cavariani, 1984). Ademais, o próprio sistema de multiplicação de sementes nos bancos de germoplasma, em que as parcelas são alocadas uma ao lado da outra, pode facilitar a fecundação cruzada entre os acessos (Valls, 2007; van Hintum et al., 2007), aumentando-se a taxa de “amostras heterozigóticas”.

Pela análise de agrupamento, utilizando-se o método UPGMA, detectaram-se 58 conjuntos com acessos geneticamente idênticos para os sete locos avaliados. A maioria desses conjuntos apresentou entre dois e quatro acessos, entretanto, chamam a atenção cinco agrupamentos com grande número de elementos, contendo 26, 14, 13, 12 e 11 acessos (Tabela 4.3). A maioria dos acessos desses cinco agrupamentos pertence à variedade botânica *pauciflora* (Figura 4.1). Comparando-se esses conjuntos com os acessos morfológicamente semelhantes, detectados na caracterização morfoagronômica, via análise de agrupamento pelo método de Ward (capítulo 3), verificou-se que houve coincidência apenas em relação aos acessos CPAC 1128 e CPAC 1129, ambos coletados no Departamento de Bolívar, na Venezuela, a uma distância de 17 km uma da outra. Há, portanto, grande probabilidade deste par de acessos, de fato, tratar-se de uma duplicata.

Todos os conjuntos de acessos semelhantes, indicados nas avaliações morfoagronômicas e moleculares, devem, assim, ser mais bem estudados, agregando-se os dados de passaporte e, também, a observação de maior número de caracteres morfológicos para a confirmação ou não da redundância. De qualquer forma, os resultados obtidos devem auxiliar os melhoristas na escolha dos materiais a serem testados agronomicamente, bem como daqueles mais divergentes entre si, para possíveis hibridações nos programas de melhoramento, evitando-se cruzamentos entre acessos muito parecidos. Esses resultados, ainda que preliminares, também subsidiam o curador do banco de germoplasma no intercâmbio de acessos, evitando-se o envio de materiais muito similares para a avaliação

Tabela 4.3. Conjuntos de acessos geneticamente idênticos, do banco de germoplasma de *S. guianensis* da Embrapa, identificados pela análise de sete locos microssatélites.

Conjunto	Nº de acessos	Acessos
1	26	1353, 1627, 2730, 2733, 2735, 2742, 2746, 2747, 2748, 2761, 2762, 2763, 2766, 2776, 4191, 4195, 4290, 4293, 4296, 4297, 4298, 5416, 5419, 5425, 5492, 5589
2	14	1134, 1138, 1238, 1622, 1629, 2724, 2727, 2734, 2738, 2739, 2753, 2759, 5607, 5392
3	13	135, 1108, 1114, 1155, 1635, 2749, 2750, 2757, 2770, 4187, 4189, 4294, 5606
4	12	1120, 1122, 1123, 1125, 1128, 1129, 1137, 1628, 2772, 4196, 4198, 5249
5	11	210, 1133, 1141, 1360, 1381, 2767, 5531, 5543, 5544, 5377, 5386
6	9	665, 1124, 1148, 1156, 1331, 1375, 1619, 1623, 1625
7	7	662, 4326, 4327, 4331, 5449, 5559, 5582
8	6	1142, 1146, 1356, 5413, 5604, 5385
9	6	1113, 1626, 2755, 4186, 4289, 5527
10	6	4122, 5495, 5501, 5502, 5530, 5542
11	5	4261, 5235, 5593, 5596, 5597
12	5	4306, 5422, 5481, 5487, 5497
13	5	1343, 2723, 4199, 5283, 5587
14	4	4317, 4320, 4323, 4333
15	4	2462, 4313, 5254, 5553
16	4	2758, 4529, 5429, 5552
17	4	4260, 5491, 5525, 5526
18	4	4267, 5343, 5511, 5514
19	4	4229, 4234, 5545, 5382
20	3	5272, 5437, 5603
21	3	1374, 5376, 5384
22	3	4284, 4285, 5237
23	2	1151, 5581
24	2	2743, 4275
25	2	1361-a, 5534
26	2	666, 2736
27	2	2203, 5571
28	2	1352, 5575
29	2	1136, 1624
30	2	1234, 4287
31	2	5488, 5572
32	2	4314, 5574
33	2	1239, 5215
34	2	648, 5469
35	2	1229, 1232
36	2	5219, 5573
37	2	1139, 5609
38	2	1140, 5560
39	2	4315, 5213a
40	2	4321, 5213
41	2	4319, 4322
42	2	4325, 4528
43	2	1366, 5435
44	2	4236, 4237
45	2	4259, 5506
46	2	4305, 5496
47	2	4307, 5499
48	2	5480, 5529
49	2	5230, 5436
50	2	5471, 5472
51	2	4286, 5380
52	2	1231, 5550
53	2	4192, 5599
54	2	465, 4337
55	2	4233, 5216
56	2	4176, 4227
57	2	4283, 5204
58	2	5445, 5482

em outros locais.

O dendrograma, formado na análise de agrupamento pelo método UPGMA, apresentou valor cofenético significativo pelo teste Z de Mantel ($r = 0,76$; $P \leq 0,0001$), o que é compatível com o valor 0,70 sugerido por Rohlf (2000), como indicativo de boa adequação do método de agrupamento em resumir a informação do conjunto de dados. Observando-se apenas o dendrograma, aparentemente, não há clara estruturação dos acessos em grupos de similaridade, entretanto quando se associam os dados das variedades botânicas, observa-se a tendência de agrupamento dos acessos pelas variedades botânicas *pauciflora*, *guianensis* e *canescens* (Figura 4.1).

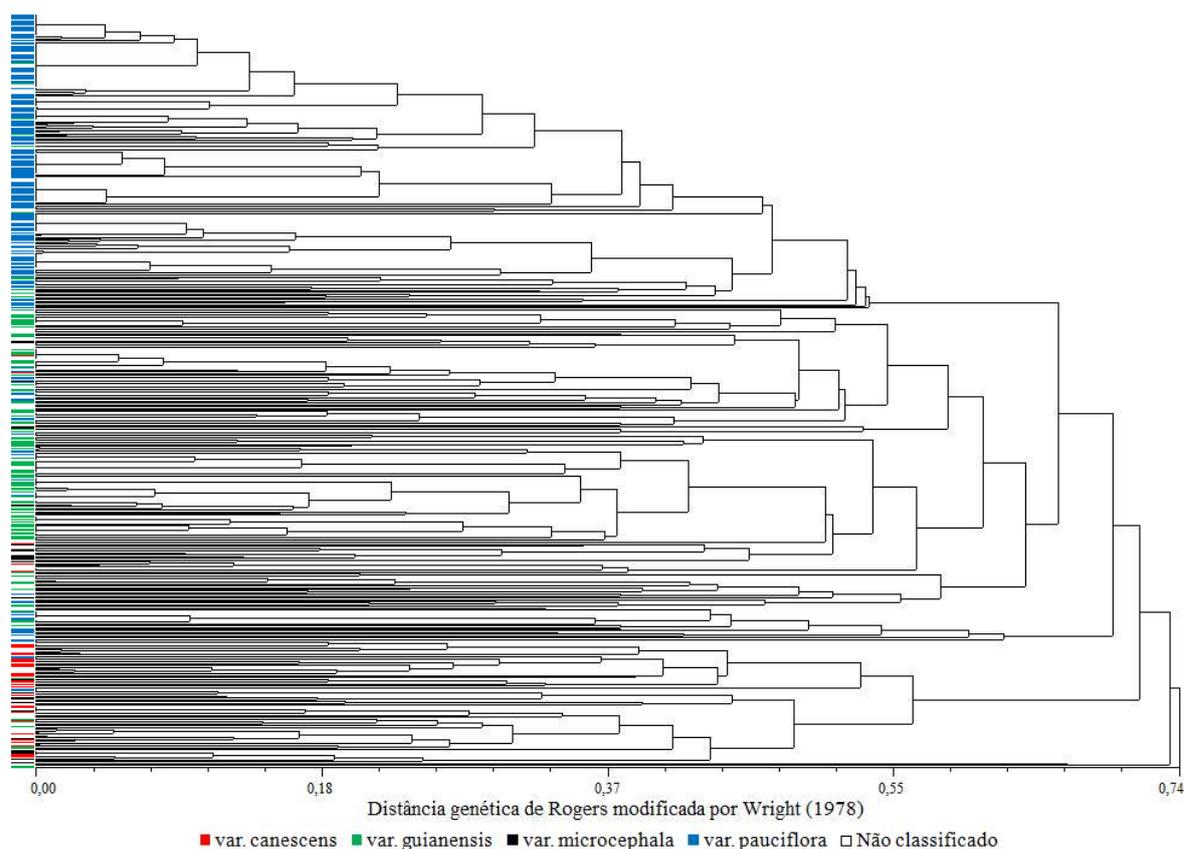


Figura 4.1. Dendrograma do agrupamento de 437 acessos de *Stylosanthes guianensis* e suas variedades botânicas, obtido pelo método UPGMA, utilizando-se a distância de Rogers, modificada por Wright (1978), a partir da avaliação de sete locos microssatélites.

Resultado semelhante foi obtido por Faleiro et al. (2003) que avaliaram uma amostra nuclear, composta por 35 acessos de *S. guianensis*, utilizando 13 *primers* RAPD. Neste trabalho foram formados oito grupos de similaridade, em que todos os 13 acessos do Grupo 8 pertenciam à variedade *pauciflora*, os quatro acessos do Grupo 3 à variedade

canescens e, dos onze acessos do Grupo 1, nove pertenciam à variedade *guianensis*. Os três acessos da variedade *microcephala* foram alocados em três diferentes grupos.

Vale lembrar que as variedades botânicas *guianensis* (=vulgaris), *microcephala* e *canescens* foram descritas por Ferreira & Costa (1979), e a variedade *pauciflora* foi descrita pouco depois, por Ferreira et al. (1985). Dessa forma, levando-se em conta que a maioria dos dados das classificações taxonômicas foi obtida das cadernetas de campo e dos relatórios de expedição de coleta dos coletores, é necessário considerar-se a existência de acessos mal classificados, sobretudo entre aqueles coletados entre 1979 e 1985. Ademais, possíveis erros podem ser cometidos na identificação taxonômica das plantas, durante as expedições de coleta dos materiais, principalmente quando os *vouchers* de herbário não são obtidos para posterior confirmação da classificação (Walter & Cavalcanti, 2005).

Na análise de coordenadas principais, a primeira coordenada respondeu por 27,71% da variação total. As demais, da segunda à sexta coordenada principal, acumularam, respectivamente, 39,50%, 49,51%, 57,29%, 63,93% e 69,80% dessa variância. A dispersão dos acessos, em relação às três primeiras coordenadas principais (Figura 4.2), também sugere a formação de três grupos de acessos.

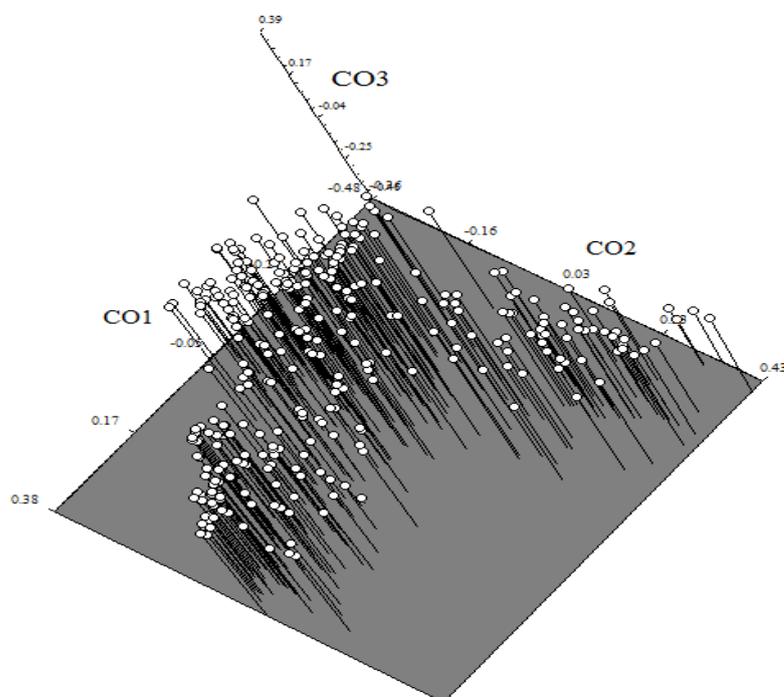


Figura 4.2. Dispersão de 437 acessos de *Stylosanthes guianensis*, em relação aos três primeiros eixos (CO1, CO2 e CO3) da análise de coordenadas principais, utilizando a matriz de distâncias genéticas de Rogers modificada por Wrigth (1978).

Observando-se a dispersão dos acessos e suas respectivas variedades botânicas, em relação às duas primeiras coordenadas principais (Figura 4.3), nota-se que, da mesma forma que no dendrograma obtido pelo método UPGMA (Figura 4.1), existe uma tendência de agrupamento dos acessos por variedades botânicas, exceto para a variedade *microcephala*.

Cabe salientar também que o teste Z de Mantel, comparando a matriz de distâncias euclidianas entre os acessos, obtida de dados morfológicos e em relação às duas primeiras coordenadas principais, com a matriz de distância genética de Rogers modificada por Wrigth (1978), foi altamente significativo ($P \leq 0,0001$), com correlação de 0,67. Portanto, pode-se considerar que a representação gráfica dos acessos, em relação às duas primeiras coordenadas, foi adequada, com correlação próxima ao valor de $r = 0,7$ preconizada por Rohlf (2000).

Segundo Costa (2006), a variedade *microcephala* é a que mais se aproxima, morfológicamente, da variedade *canescens* e, freqüentemente, as duas variedades ocorrem de forma simpátrica. Portanto, a concentração de alguns acessos da variedade *microcephala* junto com acessos da variedade *canescens*, no quadrante superior esquerdo do gráfico de dispersão (Figura 4.3), pode estar relacionada com algum fluxo gênico entre estas variedades botânicas. É interessante ressaltar que todos os acessos da variedade *microcephala*, representados nesse quadrante, foram coletados nos Estados de Tocantins e de Goiás (Figura 4.3); enquanto que, dos onze acessos representados no quadrante inferior esquerdo, oito foram coletados em Minas Gerais, um no Rio de Janeiro, um em Mato Grosso do Sul e o outro não possui registro do local de coleta. O acesso CPAC 1371, representado no quadrante inferior direito, também foi coletado em Goiás.

Costa (2006) correlaciona a ocorrência da variedade *microcephala*, no Estado de Minas Gerais, com a fertilidade do solo. De acordo com esse autor, que coletou aproximadamente 40% dos acessos estudados no presente trabalho, esta variedade botânica, em Minas Gerais, ocorre em áreas de Cerrado com solos de melhor fertilidade, em áreas de transição com o Cerradão. Conforme os registros dos coletores, o acesso proveniente do Estado do Rio de Janeiro foi coletado na Mata Atlântica, e o acesso de Mato Grosso do Sul, em área de Cerradão, isto é, em locais com maior fertilidade natural do solo.

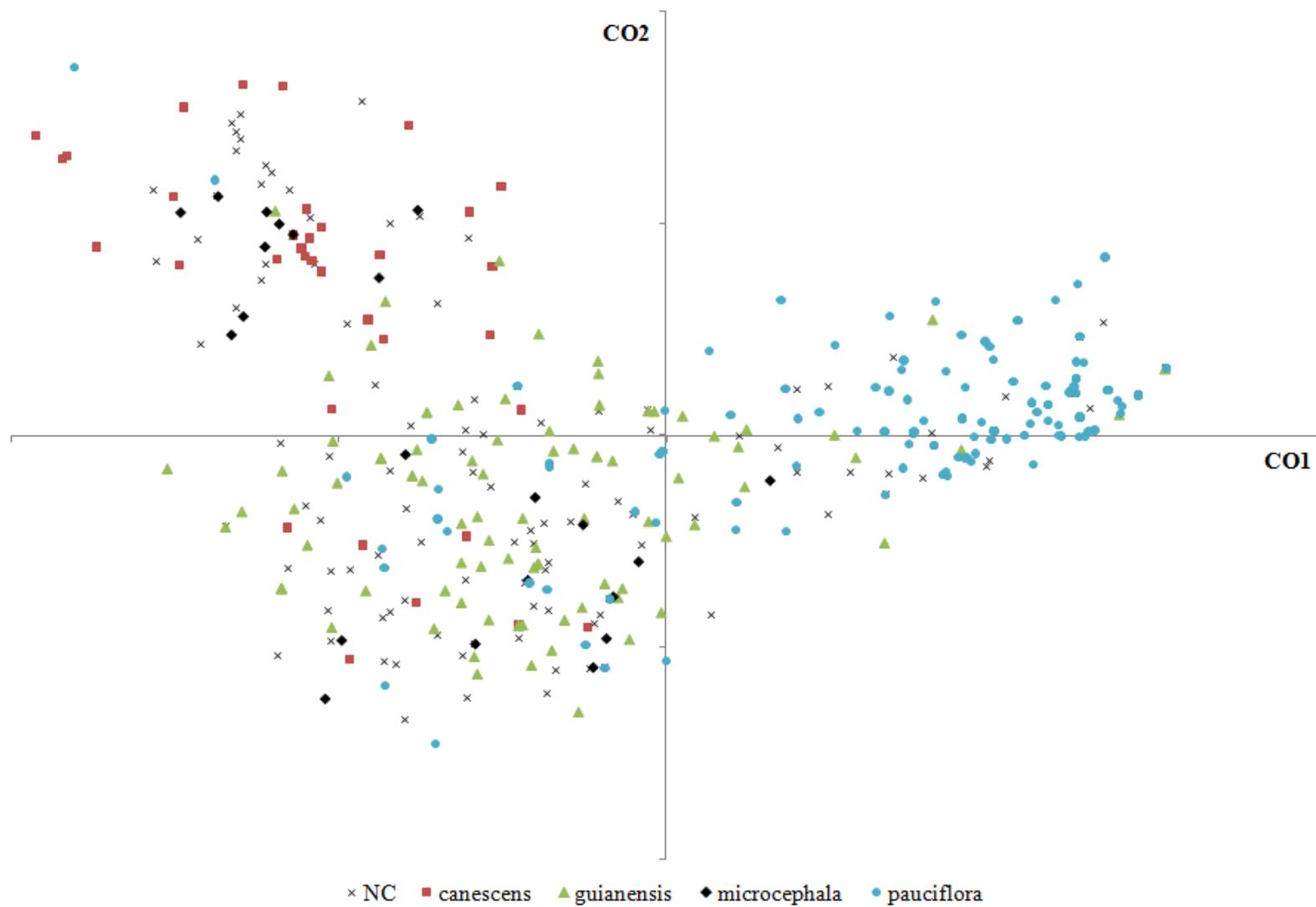


Figura 4.3. Representação gráfica de 437 acessos de *Stylosanthes guianensis*, em relação às duas primeiras coordenadas principais (CO1 e CO2), estabelecidos com base em sete locos SSR, e suas variedades botânicas, de acordo com a base de dados do registro do germoplasma (NC: acessos não classificados em relação às variedades botânicas).

Por outro lado, utilizando-se os mapas de solo do IBGE e localizando-se os sítios de coleta dos acessos da variedade *microcephala*, em Goiás e Tocantins, nota-se que os locais dessas coletas possuem, reconhecidamente, solos de baixa fertilidade natural, como: Plintossolo pétrico (CPAC 4284, CPAC 5239), Plintossolo háplico (CPAC 5432), Neossolo litólico (CPAC 4285, CPAC 5247, CPAC 5433), Cambissolo háplico (CPAC 5383, CPAC 5384) e Latossolo vermelho amarelo (CPAC 5381, CPAC 5381) (IBGE, 2008b).

Considerando-se esses aspectos, é possível levantar a hipótese de que a estruturação genética nas populações de *S. guianensis* var. *microcephala*, detectada pelos marcadores moleculares, esteja indicando um isolamento geográfico entre as populações dos dois grupos, o que pode estar associado à adaptação dessas plantas a diferentes condições de fertilidade do solo. Porém, outras avaliações, incluindo, se possível, a amostragem dos solos nos locais de coleta, devem ser realizadas para a confirmação ou não dessa hipótese, pois existe a possibilidade dessas populações estarem localizadas em manchas de solos, não detectadas pelo mapa de solo disponível. Essa informação pode ser importante para a prospecção de acessos, ou mesmo de genes, em programas de melhoramento genético que objetivem a obtenção de cultivares com maior capacidade de se desenvolverem em condições de baixa fertilidade do solo.

A classificação da espécie *S. guianensis* em variedades botânicas é baseada em caracteres morfológicos, especialmente quanto à cor e ao tamanho das sementes; ao hábito de crescimento da planta; ao tipo de caule; à presença ou ausência de pilosidade no caule, nas brácteas e nos folíolos; e ao formato e tamanho das inflorescências (Ferreira & Costa, 1979; Ferreira et al., 1983; Costa, 2006). Apesar da relação existente entre a divergência genética e as variedades botânicas, quando se compararam, pelo teste Z de Mantel, as dissimilaridades fenotípicas (obtidas na avaliação morfoagronômica) e genéticas (obtidas por microssatélites), observa-se que a correlação entre as respectivas matrizes foi significativa, porém, de baixa magnitude ($r = 0,23$; $P \leq 0,0001$).

Estudos conduzidos com o objetivo de avaliar a associação entre dissimilaridades obtidas por marcadores moleculares e variações morfológicas, em populações de plantas, têm revelado resultados divergentes. Alves (2002) avaliou 31 acessos de cupuaçuzeiro, utilizando 21 locos microssatélites e 19 descritores botânico-agronômicos, e obteve, pelo teste Z de Mantel, uma correlação de 0,72. Por outro lado, Oliveira (2005), estudando 87 acessos de açaizeiro, usando-se 22 caracteres

morfoagronômicos e sete marcadores SSR e 28 marcadores RAPD, obteve, respectivamente, as correlações de -0,05 e -0,01, pelo mesmo teste. Resultado semelhante foi obtido por Koehler-Santos et al. (2003), avaliando 37 cultivares de *Citrus*, com dezoito caracteres morfológicos e oito marcadores SSR. Lattoo et al. (2008) estudaram 53 acessos da planta medicinal *Andrographis paniculata*, utilizando oito caracteres morfoagronômicos e seis marcadores RAPD, tendo obtido uma correlação altamente significativa, porém, de média magnitude ($r = 0,547$; $P \leq 0,001$).

Segundo McKay & Latta (2002), embora amplamente utilizados, marcadores moleculares parecem ser pobres indicadores da variação de características hereditárias adaptativas, especialmente quando os caracteres avaliados são quantitativos. Os marcadores moleculares são fragmentos de DNA que se distribuem aleatoriamente no genoma e que têm a neutralidade como uma de suas principais características (Ferreira et al., 2007). Portanto, é pequena a possibilidade de os poucos fragmentos analisados no presente estudo estarem associados aos caracteres morfológicos, de natureza quantitativa, que confirmam valor adaptativo ou agronômico aos acessos.

De qualquer modo, deve-se ter em mente que, embora a caracterização por marcadores moleculares possa não informar sobre características de interesse imediato do melhorista, a sua informação acerca da divergência genética entre os acessos é de maior confiabilidade do que aquela obtida a partir da caracterização fenotípica morfoagronômica. Isso porque, embora a diversidade fenotípica seja indicativo da existência de diversidade genética, o mesmo não se pode dizer sobre a similaridade fenotípica; a qual pode ser resultante de homeostase em caracteres adaptativos, mesmo sob elevada diversidade genética. Esta diversidade, contudo, pode ser captada por meio da caracterização molecular, que incide predominantemente sobre caracteres neutros. Diante disso, considerando a grande influência do ambiente sobre os caracteres morfoagronômicos e a baixa correlação entre as distâncias genéticas e fenotípicas, pressupõe-se que a diversidade genética, no presente estudo, pode ser mais facilmente detectada pelo uso dos marcadores moleculares do que pela caracterização morfoagronômica. Além disso, essa baixa correlação também indica que ambas as variações, fenotípicas e genéticas, são importantes para explicar a estrutura da diversidade da coleção de *S. guianensis* em estudo. Dessa forma, recomenda-se que as duas avaliações sejam empregadas de maneira complementar, para a definição de estratégias de manejo do banco de germoplasma e seleção de acessos,

para avaliações agronômicas detalhadas e, ou, utilização em programas de melhoramento genético.

Nesse aspecto, a seleção de possíveis genitores, que possam conferir maior capacidade de combinação, é sempre destacada como uma das potencialidades do emprego da caracterização molecular (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Souza, 2001). A premissa é a de que cruzamentos entre genótipos com alto valor agronômico e altamente divergentes poderão resultar em progênes superiores, devido à maior probabilidade de se combinarem alelos diferentes para o caráter desejado (Falconer, 1989).

Por outro lado, os resultados encontrados na literatura são bastante inconsistentes quanto à eficiência da predição do desempenho de híbridos, por meio da estimativa da divergência genética obtida a partir de marcadores moleculares. Lorencetti et al. (2006) não encontraram correlação entre as medidas de dissimilaridade dos genitores, realizadas por meio de caracteres morfológicos e de marcadores moleculares, com a heterose e heterobeltiose dos híbridos, para o caráter rendimento de grãos, em aveia. Aguiar et al. (2007) descartaram a possibilidade de substituir o tradicional método de cruzamentos dialélicos pela análise da divergência genética obtida por marcadores SSR, na escolha de genitores em programa de melhoramento genético de eucalipto. Dias et al. (2003) revisaram 54 trabalhos, envolvendo 21 espécies, cujo objetivo era avaliar a associação entre a divergência genética, estimada por marcadores moleculares, e a heterose. Os autores constataram que em 28 deles houve associações positivas, mas, no outros 26 as correlações foram negativas ou os resultados foram inconclusivos.

Considerando-se que a hibridação artificial em *S. guianensis* é um trabalho extremamente difícil, devido ao tamanho reduzido de suas flores, tipo da inflorescência e elevada deiscência de sementes, a redução do número de acessos em cruzamentos é bastante desejável (Cameron et al., 1984). Assim, a seleção *a priori* dos parentais, considerando-se o desempenho agronômico do genótipo e a divergência genética entre eles, é uma estratégia que deve ser avaliada, pois se o resultado for positivo, poderá auxiliar sobremaneira os programas de melhoramento genético da espécie.

Na avaliação morfoagronômica da coleção, foram destacados cinco grupos de acessos com potencial de utilização em sistemas agrícolas (capítulo 3). Três deles, identificados como Grupos 2, 3 e 10, reuniram acessos com plantas de porte alto, indicando potencial para a produção de biomassa e, portanto, de utilização em sistemas de produção de forragem para alimentação animal ou adubação verde. Outro grupo apresentou

plantas eretas, com sementes mais pesadas, tendo sido indicado para testes em sistemas de integração lavoura-pecuária (Grupo 4). Por fim, o Grupo 7 reuniu acessos com plantas bastante prostradas, com maior relação diâmetro/altura e que poderiam ser testadas como plantas de cobertura, por exemplo, nas entrelinhas de culturas perenes, em taludes ou às margens de rodovias. Combinando-se esses resultados à presente análise genético-molecular (Figura 4.4), observa-se, por exemplo, que os acessos do Grupo 7 foram agregados à direita do gráfico, exceto o acesso CPAC 1369, que se apresentou bastante divergente em relação aos demais elementos do grupo. Este acesso deve, portanto, ser avaliado em relação às suas características agrônômicas para utilização como planta de cobertura, pois pode ser um interessante candidato a genitor em futuras hibridações nos programas de melhoramento genético.

Com referência aos acessos de porte mais elevado, reunidos nos Grupos 2, 3 e 10 da análise morfoagronômica, observa-se que estes se concentram no quadrante inferior esquerdo da Figura 4.4. A cultivar Mineirão está situada em posição central, em relação aos elementos desses grupos, indicando certa similaridade genética com estes acessos. Sete deles estão mais afastados dessa nuvem de pontos: CPAC 1368 (Diamantina-MG), CPAC 4188 (Lençóis-BA), CPAC 4338 (Americana-SP), CPAC 4364 (Ribeirão Preto-SP), CPAC 5454 (Uberaba-MG), CPAC 5458 (Santa Vitória-MG) e CPAC 5590 (Belo Horizonte-MG). Tais genótipos devem, portanto, ser avaliados agronomicamente de maneira detalhada, pois podem ser utilizados em hibridações artificiais, em programas de melhoramento genético da espécie. Isso, sobretudo com o intuito obter maior variabilidade para os caracteres de interesse, nas progênies resultantes de cruzamentos com a cultivar Mineirão.

No desenvolvimento de cultivares de *S. guianensis*, uma das principais preocupações é com a susceptibilidade à antracnose (Cameron et al., 1984; Miles & Grof, 1997; Andrade et al., 2004). Atualmente, a cultivar Mineirão, além de apresentar ampla adaptação, excelente produção de forragem e tolerância à seca, é o genótipo com maior resistência aos diversos isolados do fungo (Charchar et al., 2002; Andrade et al., 2004; Changjun et al., 2004). Nesse sentido, uma possibilidade é o cruzamento desta cultivar com os sete acessos anteriormente referidos, haja vista o maior distanciamento genético deles em relação à cultivar, num esquema de melhoramento genético da espécie, visando à produção de biomassa e tolerância à antracnose.

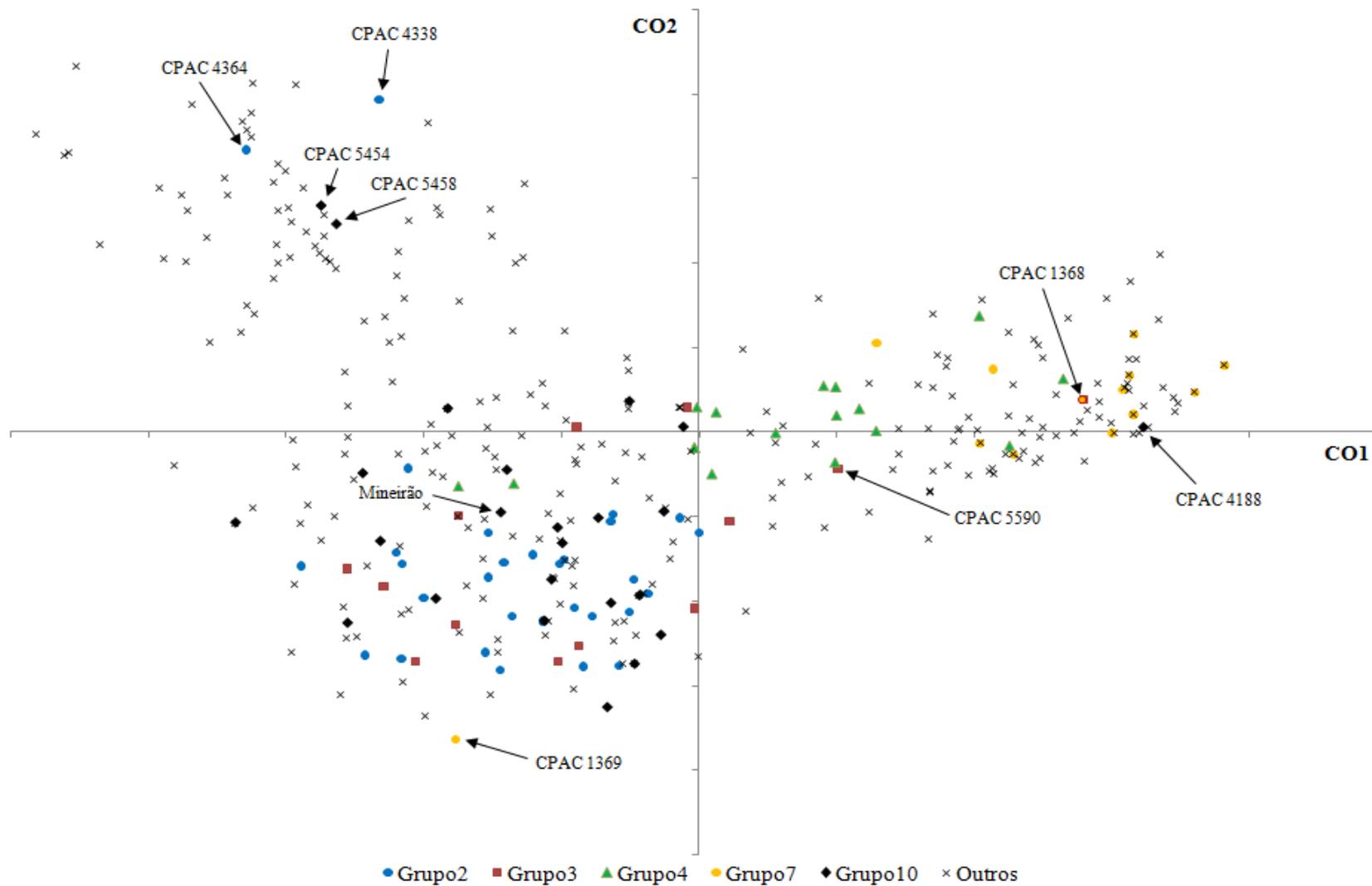


Figura 4.4. Representação gráfica de 437 acessos de *Stylosanthes guianensis*, em relação às duas primeiras coordenadas principais (CO1 e CO2), estabelecidos com base em sete locos SSR, e a indicação dos cinco grupos de acessos com potencial de utilização em sistemas agrícolas, formados a partir de caracterização morfoagronômica.

É importante frisar que as possibilidades aventadas na presente discussão são apenas indicações preliminares, que buscam promover o uso dos acessos do banco de germoplasma em estudo. De toda forma, com os resultados obtidos é possível, ainda, selecionar uma coleção com menor número de acessos para as avaliações mais detalhadas. Estudos complementares acerca da diversidade genética da coleção, com o aumento do número de locos SSR para melhoria da cobertura do genoma e, também, com a utilização de outros tipos de marcadores, são necessários e devem ser encorajados. É essencial, também, que dados sobre os aspectos ecológicos, morfológicos, fisiológicos, agronômicos e taxonômicos sejam agregados às informações genéticas, para subsidiar as decisões sobre a condução do banco de germoplasma e estimular o uso eficiente desses recursos genéticos armazenados.

4.4 CONCLUSÕES

- i)* Existe estruturação genética na coleção dos 437 acessos de *S. guianensis* avaliados, com tendência de acessos se agruparem pelas variedades botânicas *canescens*, *guianensis* e *pauciflora*.
- ii)* Grande número de acessos (58 conjuntos) são geneticamente idênticos para os sete locos microsatélites analisados. Tais acessos devem ser avaliados, com maior rigor e detalhamento, antes de serem tratados, de fato, como duplicatas no banco de germoplasma.
- iii)* A correlação entre as medidas de divergência genética molecular e morfoagronômica é muito baixa para os acessos da coleção, de modo que os dois tipos de avaliação devem ser considerados de maneira complementar, para uma melhor caracterização e uso desses acessos e, possivelmente, da espécie.
- iv)* Entre os acessos com potencial agronômico, existem genótipos que apresentam grande dissimilaridade genética entre si e com a cultivar Mineirão, devendo ser avaliados quanto à possibilidade de expressarem maior variabilidade os caracteres de interesse, em cruzamentos dirigidos.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Pelos resultados obtidos das caracterizações morfoagronômica e molecular dos acessos da coleção de *S. guianensis* da Embrapa, é possível concluir que ambas fornecem subsídios complementares para a seleção de genótipos a serem avaliados com objetivos específicos (ex. produção de biomassa, cobertura do solo ou para uso em outros sistemas de produção). Assim, a rigor, no caso da espécie estudada, a caracterização morfoagronômica não deve ser substituída pela caracterização molecular, nem o contrário.

Outra constatação fundamental para o aproveitamento direto dos acessos, seja nos sistemas produtivos ou em programas de melhoramento genético, é que estes acessos estejam organizados de forma que facilite a identificação de genótipos potencialmente superiores. Vale ressaltar que as caracterizações realizadas no banco de germoplasma são relativamente superficiais, dado o grande número de acessos em avaliação. Assim, o aproveitamento dos acessos selecionados previamente no BAG depende, grandemente, de avaliações complementares mais detalhadas, sobretudo para os caracteres agronômicos de interesse.

Com relação às possíveis duplicatas identificadas, embora a recomendação geral seja a de armazenar no BAG apenas uma das amostras, as conclusões do presente estudo indicam que, a princípio, deve-se evitar o descarte de acessos semelhantes, porém não idênticos, até que resultados mais definitivos obtidos de marcadores moleculares e/ou de descritores morfológicos estáveis (de alta herdabilidade), aliados aos dados de passaporte, possam confirmar tais duplicidades.

6 REFERÊNCIAS

AGUIAR, M. S. de; FERREIRA, D. F.; AGUIAR, A. M.; BISON, O.; REZENDE, G. D. S. P.; GRATTAPAGLIA, D. Potencial de híbridos entre clones-elite de eucalipto por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p.1007-1012, 2007.

ALLEM, A. C. **Manejo de coleções-base: a coleção de sementes examinada**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 23 p.

ALVES, R. M. **Caracterização genética de populações de cupucuazeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânicos-agronômicos**. 2002. 156 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ANDRADE, R. P. de. Pasture seed production technology in Brazil. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro: SBZ, 2001. p. 129-132.

ANDRADE, R. P. de; KARIA, C. T. O uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGEM: TEMAS EM EVIDÊNCIA, 1. 2000. Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2000. p. 273-309.

ANDRADE, R. P. de; KARIA, C. T.; RAMOS, A. K. B. R. *Stylosanthes* as a forage legume at its centre of diversity. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.). **High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems**. Adelaide: Australian Centre for International Agricultural Research, 2004. p. 39-50.

AZEVEDO, C. M. A. A Regulamentação do acesso aos recursos genéticos e aos conhecimentos tradicionais associados no Brasil. **Biota Neotropica**. Campinas: BIOTA/FAPESP, v. 5, n. 1. 9 p. Jan/jun 2005. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v5n1/pt/fullpaper?bn00105012005+pt>>. Acesso em: 23 fev. 2008.

BAH, S.; DIALLO, D.; DEMBELE, S.; PAULSEN, B. S. Ethnopharmacological survey of plants used for the treatment of schistosomiasis in Niono District, Mali. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 105, n. 3, p. 387-399, 2006.

BARCELLOS, A. de O. Sistemas extensivos e semi-intensivos de produção: pecuária bovina de corte nos cerrados. In: SIMPOSIO SOBRE O CERRADO, 8.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS, 1., 1996. Brasília. Biodiversidade e produção sustentável de alimentos e fibras nos Cerrados: **Anais...** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1996. p. 130-136

BARCELLOS, A. de O.; ANDRADE, R. P. de; KARIA, C. T.; VILELA, L. Potencial do uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. In: PEIXOTO, A. M.; PEDREIRA, C. G. S. (Org.). **A planta forrageira no sistema de produção**. Piracicaba: FEALQ, 2001b, v. 1, p. 365-426.

BARCELLOS, A. de O.; VILELA, L. LUPINACCI, A. V. Produção animal a pasto: desafios e oportunidades. In: ENCONTRO NACIONAL DO BOI VERDE: A PECUÁRIA SUSTENTÁVEL, 3., 2001. Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: Sindicato Rural de Uberlândia, 2001. p. 29-64.

BARNARD, C. (Comp.). **Register of Australian herbage plant cultivars**. Canberra: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1972. 260 p.

BARRIGA, J. P. **Autoecologia de *Stylosanthes humilis* H.B.K.: Avaliação da variabilidade morfológica e estudos da biologia de semente**. 1979. 97 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1979.

BARROS, A. M. C.; FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; SHIRATSUCHI, L. S.; ANDRADE, R. P. de; LOPES, G. K. B. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 9, p. 899-909, 2005.

BARROS, L. M. **Avaliação da variabilidade de caracteres agronômicos em populações de *Stylosanthes guianensis* (Albl.) Sw.** 1978. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1978.

BATTISTIN, A. **Estudo biosistemático de diferentes taxons do gênero *Stylosanthes* Sw. (*Leguminosae - Papilionoideae*)**. 1981. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1981.

BATTISTIN, A.; MARTINS, P. S. Variability in morphological characters of different taxons of the genus *Stylosanthes* Sw. (*Leguminosae-Papilionoideae*). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 111-121, 1988.

BEEBE, S.; SKROCH, P. W.; THOME, J.; DUQUE, M. C.; PEDRAZA, F.; NIENHUIS, J. Structure of genetic diversity among common bean landraces of middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 1, p. 264-273, 2000.

BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; FERREIRA, C. F.; KARIA, C. T.; FONSECA, K. G. da; SANTOS, J. R. P.; TEIXEIRA, M. A.; JUNQUEIRA, K. P. Validação e otimização de protocolo simplificado para extração de DNA a partir de tecido foliar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., 2007, São Lourenço. **Anais...** Lavras: UFLA, Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2007, 3 p. 1 CD-ROM.

BRASIL. Ministério da Agricultura - Departamento Nacional da Produção Animal. **Informações sobre algumas plantas forrageiras**. 4. ed. Rio de Janeiro, 1937. 201 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro Nacional de Cultivares**. Brasília, MAPA, 2008b. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 06 jun. 2008.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. **Sistema Aliceweb**. Brasília, MDIC, 2008a. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/alice.asp>>. Acesso em: 06 jun. 2008.

BRONDANI, C.; BORBA, T. C.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V. Determination of genetic variability of traditional varieties of Brazilian rice using microsatellite markers. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 4, p. 676-684, 2006.

BROWN, A. H. D. The case for core collections. In: BROWN, A. H. D.; FRANKEL, O.; MARSHALL, D. R.; WILLIAMS, J. T. (Ed.). **The use of plant genetic resources**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989a. p. 136-156.

BROWN, A. H. D. Core collections: a practical approach to genetic resources managements. **Genome**, Ottawa, v.31, n. 2, p. 818-824, 1989b.

BURT, R. L. Natural variation in *Stylosanthes*. In STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press Australia, 1984. p. 103-123.

CAMERON, D. F.; CHAKRABORTY, S. Forage potential of *Stylosanthes* in different production systems. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.). **High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems**. Adelaide: Australian Centre for International Agricultural Research, 2004. p. 27-38.

CAMERON, D. F.; HUTTON, E. M.; MILES, J. W. BROLMANN, J. B. Plant breeding in *Stylosanthes*. In: **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press Australia, 1984. p. 589-606.

CATCHPOOLE, V. R.; OXENHAM, D. J.; HARPER, L.A. Transformation and recovery of urea applied to a grass pasture in south-eastern Queensland. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, Canberra, v. 23, n. 120, p. 80-86, 1983.

CHANGJUN, B.; GUODAO, L.; DONGJIN, W. Selecting high-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* in Hainan. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.). **High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems**. Adelaide: Australian Centre for International Agricultural Research, 2004. p. 143-151.

CHARCHAR, M. J. D.; ANJOS, J. R. N. dos; GOMES, A. C.; TOMAZ, L. V.; AKIMOTO, A. K.; KARIA, C. T. Avaliação de acessos de *Stylosanthes* spp. em relação à

antracnose, em condições de campo, no Distrito Federal, Brasil. Brasília: Embrapa Cerrados, 2002. 14 p. (Embrapa Cerrados - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 77).

CHECA, M. L.; CARLEOS, C.; BARO, J. A.; DUNNER, S.; CAÑÓN, J. Estimación e frecuencias alélicas em pools de ADN mediante el procesamiento de señales de electroforesis capilar. **ITEA. Producción animal**, Zaragoza, v. 96, n. 3, 2000, p. 225-234.

CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; COLOMBO, C. A.; DIAS, L. A. S.; ITO, M. F. Genetic diversity of common bean accessions in the germplasm bank of the Instituto Agrônômico – IAC. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2005.

CIDADE, F. W.; DALL'AGNOL, M.; BERED, F.; SOUZA-CHIES, T. T. de. Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flüggé (Paniceae: Panicoideae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 51, n. 3, p. 235-246, 2008.

CNPC. CONSELHO NACIONAL DA PECUÁRIA DE CORTE. **Balço da pecuária bovÍdea de corte 1994 a 2007**. São Paulo, CNPC, 2008. Disponível em <<http://www.cnpc.org.br/site/balanco.asp>>. Acesso em: 06 jun. 2008.

COELHO, A. S. G.; VALVA, F. D. O processo evolutivo e o melhoramento de plantas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. Cap. 3. p. 57-78.

CORBUN, J. R.; TEMNYKH, S. V.; PAUL, E. M.; MCCOUCH, S. R. Design and application of microsatellite marker panels for semiautomated genotyping of rice (*Oryza sativa* L.). **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 2092-2099, 2002.

CORDEIRO, C. M. T.; ABADIE, T. Coleções nucleares. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. Cap. 17. p. 575-604.

COSTA, M. N. da; PEREIRA, W. E.; BRUNO, R. L. A.; FREIRE, E. C.; NOBREGA, M. B. M.; MILANI, M.; OLIVEIRA, A. P. de. Divergência genética entre acessos de cultivares de mamoneira por meio de estatística multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1617-1622, 2006.

COSTA, N. M. S. **Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw.** 2006. 469 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) – Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2006.

COSTA, N. M. S.; FERREIRA, M. B. **O gênero *Stylosanthes* no estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1982. 56 p.

COSTA, N. M. S.; FERREIRA, M. B. Some Brazilian species of *Stylosanthes*. In STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press Australia, 1984. p. 23-48.

CROSSA, J.; FRANCO, J. Statistical methods for classifying genotypes. **Euphytica**, Wageningen, v. 137, n. 1, p. 19-37, 2004.

CRUZ, C. D. **Programa Genes versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001. 648 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético - volume 1**. 3. ed., Viçosa: UFV, 2004. 480 p.

CURY, R. **Dinâmica evolutiva e caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) na agricultura autóctone do sul do Estado de São Paulo**. 1993. 103f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, 1993.

DANIELS, J.; HOLMANS, P.; WILLIAMS, N.; TURIC, D.; Mc GUFFIN, P. A simple method for analyzing allele image patterns generated from DNA pools and its application to allelic association studies. **American Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 5, p. 1189–1197, 1998.

DIAS, L. A. S. **Divergência genética e fenética multivariada na predição de híbridos e preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 1994. 94 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, 1994.

DIAS, L. A. S.; PICOLI, E. A. T.; ROCHA, R. B.; ALFENAS, A. C. A priori choice of hybrid parents in plants. **Genetic and Molecular Research**. Ribeirão Preto, v. 3, n. 3, p. 356-368, 2004.

DUARTE, J. B. **Sobre o emprego e a análise estatística do delineamento em blocos aumentados no melhoramento genético vegetal**. 2000. 293 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

EDYE, L. A. Commercial development of *Stylosanthes* pastures in Northern Australia. I. Cultivar development within *Stylosanthes* in Australia. **Tropical Grasslands**, St. Lucia, v. 31, n. 5, p. 503-508, 1997.

EDYE, L. A.; GROF, B.; WALKER, B. Agronomic variation and potential utilization of *Stylosanthes*. In STACE, H. M.; EDYE, L. A., ed. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press Australia, 1984. p. 547-570.

EDYE, L. A.; HALL, R. J.; CLEM, R. L.; GRAHAM, T.W. G.; MESSER, W. B.; REBGETZ, R. H. Sward evaluation of eleven *Stylosanthes seabrana* accessions and *S. scabra* cv. Seca at five subtropical sites. **Tropical Grasslands**, St. Lucia, v. 32, n. 4, p. 243-251, 1998.

EMBRAPA CERRADOS. **Estabelecimento e utilização do estilosantes Mineirão**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1998. 6 p. (Embrapa Cerrados, Comunicado Técnico, 74).

EMBRAPA GADO DE CORTE. **Estilosantes Campo Grande: estabelecimento, manejo e produção animal**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. 8p. (Embrapa Gado de Corte, Comunicado Técnico, 61).

ENGELS, J.; VISSER, B. Genebank management procedures. In: ENGELS, J.; VISSER, B. (Ed.). **A guide to effective management of germplasm collections**. Rome: IPGRI, 2003. p. 60-79. (IPGRI Handbooks for genebanks, 6).

EUCLIDES, V. P. B.; EUCLIDES FILHO, K.; COSTA, F.P.; FIGUEREDO, G. R. Desempenho de novilhos F1s angus-nelore em pastagens de *Brachiaria decumbens* submetidos a diferentes regimes alimentares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, n. 2, p. 470-481, 2001.

EUCLIDES FILHO, K. O enfoque de cadeia produtiva como estratégia de produção sustentável de carne bovina. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2004. p. 205-212.

EYLES, A. G. Forage cultivars released for use in Queensland. **Tropical Grasslands**, St. Lucia, v. 23, n. 2, p. 115-117, 1989.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. 3 ed. London: Longman, 1989. 438 p.

FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. de; BARROS, A. M. C.; SILVA, D. O. C. Diversidade genética de uma coleção de trabalho de *Stylosanthes guianensis* com base em marcadores RAPD. . In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: SBZ, 2003, 6 p. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. de; RAMOS, A. K. B. Seleção de genitores de *Stylosanthes guianensis* utilizando a diversidade genética analisada com base em características morfológicas, agrônômicas e moleculares. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004, 6 p. 1 CD-ROM.

FEDERER, W. T. Augmented (or hoonuiaku) designs. **Hawaiian Planter's Records**, Aiea, v. 55, n. 2, p. 191-208, 1956.

FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. **O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1979. 108 p.

FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S.; SCHULTZE-KRAFT, R. *Pauciflora* uma nova variedade de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 36., Curitiba, 1985. **Anais...** Curitiba, Sociedade Botânica do Brasil, 1986. p. 323.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996, 220 p. (Embrapa-Cenargen, Documentos, 20).

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos da caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. Cap. 11. p. 377-420.

FERRO, A. F.; BONACELLI, M. B.; ASSAD, A. L. Uso da biodiversidade e acesso a recursos genéticos no Brasil: atual regulamentação dificulta pesquisa e desenvolvimento. **Inovação Uniemp**, Campinas, v. 2, n. 2, p.16-17, abr./jun. 2006.

FRANKEL, O. H. Genetic perspectives of germplasm conservation. In: ARBER, W. K.; LLIMENSEE, K.; PEACOCK, W. J.; STARLINGER, P. (Ed.). **Genetic manipulation: impact on man and society**. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. p. 161-170.

FRANKEL, O. H. Principles and strategies of evaluation. In: BROWN, A. H. D.; FRANKEL, O. H.; MARSHALL, D.R. WILLIAMS, J. T. (Ed.). **Genetic resources in plants**. London: Cambridge University Press, 1989. p. 245-260.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D. Plant genetic resources today: a critical reappraisal. In: HOLDEN, J. H. W.; WILLIAMS, J. T. (eds.) **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: George Allen & Unwin, 1984. p. 249-257.

FU, Y. Application of bulking in molecular characterization of plant germplasm: a critical review. **Plant Genetic Resources**, Cambridge, v. 1, n. 2-3, p. 161-167, 2003.

GILLIES, A. C. M.; ABBOTT, R. J. Molecular analysis of genetic diversity and evolutionary relationships in *Stylosanthes* (Aubl.) Sw. In: REGIONAL WORKSHOP ON THE USE OF *Stylosanthes* IN WEST AFRICA, 1994. Kaduna. **Proceedings...** Addis Ababa, ILCA, 1994. p. 37-53.

GOODMAN, M. M. Genetic and germ plasm stocks worth conserving. **Journal of Heredity**, Cary, v. 81, n. 1, p. 11-16, 1990.

GROWER, J. C. Some distance proprieties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, London, v. 53, n. 3-4, p. 325-338, 1966.

GROWER, J. C. Multivariate analysis and multidimensional geometry. **Statistician**, Oxford, v. 17, n. 1, p.13-28, 1967.

GUODAO, L.; CHANGJUN, B.; DONGJIN, W.; HUAXUAN, H. *Stylosanthes* cultivars in China: their development and performance. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.). **High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems**. Adelaide: Australian Centre for International Agricultural Research, 2004. p. 153-158.

GUODAO, L.; CHANGJUN, B.; KEXIAN, Y. Two new Stylo varieties released in China. **Stylo International**. Brisbane: CSIRO. March 2002. 4 p.

HALL, T. J.; GLATZLE, A. Cattle production from *Stylosanthes* pastures. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.). **High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for**

agricultural systems. Adelaide: Australian Centre for International Agricultural Research, 2004. p. 51-64.

HE, C.; SCHULTZE-KRAFT, R. Pi Hua Dou 184 (*Stylosanthes guianensis* CIAT 184) – nueva leguminosa forajera en China tropical. **Pasturas Tropicales**, Cali, v. 10, n. 1, p. 34-35, 1988.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; DLOUHY, S. R.; VANCE, G. H.; VOGT, P. H. Multiplex PCR Critical Parameters and step-by-step protocol. **BioTechniques**, Notick, v. 23, n. 3, p. 504-511, 1997.

HIDALGO, R. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. In: FRANCO, T. L.; HIDALGO, R. (Eds.). **Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos**. Roma: IPIGRI, p. 2-26, 2003.

HUMPHREYS, M. O. Utilization of plant genetic resources in breeding for sustainability. **Plant Genetic Resources**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 11-18, 2003.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE: Estatística da produção agrícola – abril/2008**. Rio de Janeiro: IBGE, 2008a. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>>. Acesso em: 06 jun. 2008.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapas Interativos: Mapas de Solos**. Rio de Janeiro: IBGE, 2008b. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br/solos/viewer.htm>>. Acesso em: 10 jul. 2008.

IBPGR. INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **Report of the third external review of the International Board for Plant Genetic Resources**. Rome: IBPGR, 1991. 85p.

IDRIS, S.; SAAD, M. S. Characterization of plant genetic resources. In: SAAD, M. S.; RAO, V. R. (Eds.). **Establishment and management of field genebank, a training manual**. Serdang: IPGRI-APO, 2001. p. 81-86.

ISON, R.L.; HUMPHREYS, L. R. Reproductive physiology of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press Australia, 1984. p. 257-277.

JIANG, C. S.; MA, X. R.; ZHOU, D. M.; ZHANG, Y. Z. AFLP analysis of genetic variability among *Stylosanthes guianensis* accessions resistant and susceptible to the stylo anthracnose. **Plant breeding**, Berlim, v. 124, n. 6, p. 595-598, 2005.

JOLLIFFE, I. T. Discarding variables in a principal component analysis. I. Artificial data. **Applied Statistics**, London, v. 21, n. 1, p. 167-173, 1972.

JOLLIFFE, I. T. Discarding variables in a principal component analysis. II. Real data. **Applied Statistics**, London, v. 22, n. 1, p. 21-31, 1973.

- JOLLIFFE, I. T. **Principal component analysis**. 2. ed. New York: Springer, 2004. 487 p.
- JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 3. ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1992, 642 p.
- KARIA, C. T. Conservação, caracterização e avaliação de germoplasma de plantas forrageiras tropicais na Embrapa Cerrados. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 24., 2007, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ/USP – Departamento de Genética, 2007. p. 10-14.
- KARIA, C. T., ANDRADE, R. P. de. Avaliação preliminar de espécies forrageiras no Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrado: perspectivas futuras. In: SIMPOSIO SOBRE O CERRADO, 8.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS, 1., 1996, Brasília. **Anais...** Planaltina: Embrapa - CPAC, 1996. p. 471-475.
- KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. de; CHARCHAR, M. J. A; GOMES, A. C. Caracterização de acessos de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. através da análise multivariada. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, Juiz de Fora, 1997. **Anais...** Juiz de Fora, SBZ, 1997. p. 45-47, v. 2.
- KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. de; CHARCHAR, M. J. A.; GOMES, A. C. **Caracterização morfológica de acessos do gênero *Stylosanthes* no banco ativo de germoplasma da Embrapa Cerrados – Coleção 1994/1995**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 24 p. (Embrapa Cerrados - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 72).
- KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. de; FERNANDES, C. D.; SCHUNKE, R. M. Gênero *Stylosanthes*. In: FONSECA, D. M. da; MARTUSCELLO, J. A. **Plantas forrageiras**. Viçosa: UFV, no prelo.
- KARZAN, K; MANNERS, J. M.; CAMERON, D. F. Genetic relationship and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genome**, Ottawa, v. 36, n. 1, p. 43-49, 1992a.
- KARZAN, K; MANNERS, J. M.; CAMERON, D. F. Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in a interespecific cross in the genus *Stylosanthes*. **Genome**, Ottawa, v. 36, n. 1, p. 50-56, 1992b.
- KARZAN, K; MANNERS, J. M.; CAMERON, D. F. Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 6-7, p. 882-888, 1993.
- KOEHLER-SANTOS, P.; DORNELLES, A. L. C.; FREITAS, L. B. de. Characterization of mandarin *citrus* germplasm from Southern Brazil by morphological and molecular analyses. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 747-806, 2003.
- LASCANO, C. E.; PIZARRO, E. (Ed.). **Evaluación de pasturas con animales: alternativas metodológicas**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1984. 290 p.

LATTOO, S. K.; DHAR, R. S.; KHAN, S.; BAMOTRA, S.; BHAN, M. K.; DHAR, A. K.; GUPTA, K. K. Comparative analysis of genetic diversity using molecular and morphometric markers in *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 55, n. 1, p. 33-43, 2008.

LAZAROTTO-FORMAGINI, E.; RESENDE, R. M. S.; MATIDA, E. T. M.; CHIARI, L.; ROBLES, C. S. Agrupamento de acessos de *Stylosanthes capitata* Vogel por meio de análise multivariada. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Anais...**, João Pessoa: SBZ, UFPB, 2006. 3 p. 1 CD-ROM.

LI, Y.; GUAN, R.; LIU, Z.; MA, Y.; WANG, L.; LI, L.; LIN, F.; LUAN, W.; CHEN, P.; YAN, Z.; GUAN, Y.; ZHU, L.; NING, W.; SMULDERS, M. J. M.; LI, W.; PIAO, R.; CUI, Y.; YU, Z.; GUAN, M.; CHANG, R.; HOU, A.; SHI, A.; ZHANG, B.; ZHU, S.; QIU, L. Genetic structure and diversity of cultivated soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) landraces in China. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, n. 6, p. 857-871, 2008 (versão *online first*).

LI, Z.; NELSON, R. L. RAPD marker diversity among cultivated and wild soybean accessions from four chinese provinces. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 5, p. 1737-1744, 2002.

LIU, C. J.; MUSIAL, J. M. Restriction fragment length polymorphism detected by cDNA and genomic DNA clones in *Stylosanthes*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 91, n. 8, p. 1210-1213, 1995.

LIU, C. J.; MUSIAL, J. M. The application of chloroplast DNA clones in identifying maternal donors for polyploidy species of *Stylosanthes*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 1, p. 73-77, 2001.

LOCH, D. S.; FERGUSON, J. E. Tropical and subtropical forage seed production: an overview. In: LOCH, D. S.; FERGUSON, J. E (Eds.). **Forage seed production. Volume 2: tropical and subtropical species**. Wallingford: CABI Publishing, 1999. p. 1-40.

LORENCETTI, C.; CARVALHO, F. I. F. de; OLIVEIRA, A. C. de; VLÉRIO, I. P.; BENIN, G.; ZIMMER, P. D.; VIEIRA, E. A. Distância genética e sua associação com heterose e desempenho de híbridos em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 4, p. 591-598, 2006.

MAASS, B.L; SAWKINS, M. History, relationships and diversity among *Stylosanthes* species of commercial significance. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.). **High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems**. Adelaide: Australian Centre for International Agricultural Research, 2004. p. 9-26.

MACEDO, M.C. M. Pastagens no ecossistema cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: SBZ, UFG, 2005. p. 56-84.

MALAIRAJAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G.; NARASIMHAN, S.; VENI, K. J. K. Analgesic activity of some Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 106, n. 3, p. 425-428, 2006

MANLY, B. F. J. **Multivariate statistical methods: a primer**. New York: Chapman and Hall, 1986, 159 p.

MANNETJE, L. 't. Consideration on the taxonomy of the genus *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Eds.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press Australia, 1984. p. 1-21.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Birmingham, v. 27, n. 2, p. 209-202, 1967.

MARDIA, K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J. M. **Multivariate analysis**. London: Academic Press, 1979. 518 p.

MARIAC, C.; LUONG, V.; KAPRAN, I.; MAMADOU, A.; SAGNARD, F.; DEU, M.; CHANTEREAU, J.; GERARD, B.; NDJEUNGA, J.; BEZANÇON, G.; PHAM, J.; VIGOUROUX, Y. Diversity of wild and cultivated pearl millet accessions (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.) in Niger assessed by microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 1, p. 49-58, 2006.

McGARIGAL, K.; CUSHMAN, S.; STAFFORD, S. **Multivariate statistics for wildlife and ecology research**. New York: Springer, 2000, 283 p.

McKAY, J. K.; LATTA, R. G. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 17, n. 6, p. 285-291, 2002.

McKEON, G. M.; MOTT, J. J. Seed biology of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press Australia, 1984. p. 311-332.

MELO, L. A. M. P. de; BURLE, M. L.; NORONHA, S. E. de. **Sistema de informação gográfica aplicado a recursos genéticos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 37 p.

MILES, J. W. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of outcrossing rate in *Stylosanthes guianensis*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 36, n. 2, p. 259-265, 1985.

MILES, J. W. Natural outcrossing in *Stylosanthes capitata*. **Tropical Grasslands**, St. Lucia, v. 17, n. 3, p. 114-117, 1983

MILES, J. W.; GROF, B. Recent advances in studies of anthracnose of *Stylosanthes*. **Tropical Grasslands**, St. Lucia, v. 31, n. 5, p. 430-434, 1997.

MILLER, C. P.; RAINS, J. P.; SHAW, K. A.; MIDDLETON, C. H. Commercial development of *Stylosanthes* pastures in Northern Australia. II. *Stylosanthes* in the

northern Australian Beef Industry. **Tropical Grasslands**, St. Lucia, v. 31, n. 5, p. 509-514, 1997.

MILLIGAN, G. W.; COOPER, M. C. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. **Psychometrika**, Baltimore, v. 50, n. 2, p. 159-179, 1985.

MILLIGAN, G. W.; COOPER, M. C. Methodology review: clustering methods. **Applied Psychological Measurement**. v. 11, n. 4, p.329-353, 1987. Disponível em: <<http://apm.sagepub.com/cgi/reprint/11/4/329>>. Acesso em: 20 mai. 2008.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: UFMG, 2007. 295 p.

MOHLENBROCK, R. H. A revision on the genus *Stylosanthes*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 44, n. 4, p. 299-354, 1958.

MOREIRA, J. A. N.; SANTOS, J. W. dos; OLIVEIRA, S. R. M. **Abordagens e metodologias para avaliação de germoplasma**. Campina Grande: Embrapa-CNPQ; Brasília: Embrapa-SPI. 1994. 115 p.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, York, v.3, n.1, p. 175-182, 1993.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. **Methods Enzymol**. New York, v. 155, p.335-350, 1987.

NASCIMENTO FILHO, F. J. do; ATROCH, A. L.; SOUSA, N. R. de; GARCIA, T. B.; CRAVO, M. S.; COUTINHO, E. F. Divergência genética entre clones de guaranazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 501-506, 2001.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. Cap. 2. p. 29-55.

NETTO, D. A. M.; SOUZA, I. R. P.; OLIVEIRA, A. C.; ANDRADE, R. V. Avaliação agronômica e molecular de acessos da coleção núcleo de milho, subgrupo endosperma duro. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 92-107, 2004.

OKPUL, T.; SINGH, D.; GUNUA, T.; WAGIH, M. E. Assessment of diversity using agromorphological traits for selecting a core sample of Papua New Guinea taro (*Calocasia esculenta* (L.) Schott) collection. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 51, n. 6, p. 671-678, 2004.

OLIVEIRA, M, S. P de. **Caracterização molecular e morfo-agronômica de germoplasma de açaizeiro**. 171 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

OLIVEIRA, M. S. P. de; FERREIRA, D. F.; SANTOS, J. B. dos. Divergência genética entre acessos de açaizeiro fundamentada em descritores morfoagronômicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 501-506, 2007.

ORTIZ, R. CROSSA, J.; FRANCO, J.; SEVILLA, R.; BURGUEÑO, J. Classification of Peruvian highland maize races using plant traits. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 55, n. 1, p. 151-162, 2008.

PATERNIANI, E.; GOODMAN, M. M. **Races of maize in Brazil and adjacent areas.** Mexico: CYMMIT, 1977. 95 p.

PALADINES, O. **Potential for increasing beef production in the American Tropics: management and utilization of native pastures in the tropics.** Cali: CIAT, 1974. 32 p.

PATHAK, P. S.; RAMESH, C. R.; BHATT, R. K. *Stylosanthes* in the reclamation and development of degraded soils in India. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.). **High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems.** Adelaide: Australian Centre for International Agricultural Research, 2004. p. 85-95.

PAULA-MORAES, S. V.; CARVALHO, G. S.; RAMOS, A. K. B.; VILELA, M. F.; VILELA, L.; AUAD, A. M.; TAKADA, A. S.; BARCELLOS, A. de O. Ocorrência da cigarrinha-das-pastagens *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) em gramíneas forrageiras e sua distribuição em áreas de Cerrado e na Amazônia Legal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006, 6 p. 1 CD-ROM.

PEETERS, J. P.; WILLIAMS, J. T. Towards better use of genebanks with special reference to information. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Roma: FAO, n. 60, p. 22-32, 1984.

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

PEREIRA FILHO, I. A.; CAVARIANI, C. Taxa de hibridação natural do feijoeiro comum em Patos de Minas, Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 19, p. 1181-1183, 1984.

PHAIKAEW, C.; RAMESH, C. R.; KEXIAN, Y.; STÜR, W. utilization of *Stylosanthes* as a forage crop in Asia. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.). **High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems.** Adelaide: Australian Centre for International Agricultural Research, 2004. p. 65-76.

PHILIPPEAU, G. **Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales.** Paris: Institut Technique des Céréales et Fourrages - ITCF, 1986, 63 p.

POLIGNANO, G. B.; UGGENTI, P.; ALBA, V.; BISIGNANO, V.; DELLA GATTA, C. morpho-agronomic diversity in grasspea (*Lathyrus sativus* L.). **Plant Genetic Resources**, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 29-34, 2005.

POMPEU, A. S. Polinização cruzada natural no feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 22, n. 5, p. 53-57, 1963.

REGISTER of Australian herbage plant cultivar. B. Legumes. 12. Stylo. a. *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. var. *guianensis* (stylo) cv. Graham. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, Melbourne, v. 46, n. 2, p.137-138, 1980a.

REGISTER of Australian herbage plant cultivar. B. Legumes. 12. Stylo. c. *Stylosanthes hamata* (L.) Taub (Caribbean stylo) cv. Verano. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, Melbourne, v. 41, n. 4, p. 271-272, 1975.

REGISTER of Australian herbage plant cultivar. B. Legumes. 12. Stylo. d. *Stylosanthes scabra* Vog. (shubby stylo) cv. Fitzroy. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, Melbourne, v. 46, n. 2, p. 133-140, 1980b.

REGISTER of Australian herbage plant cultivar. B. Legumes. 12. Stylo. d. *Stylosanthes scabra* Vog. (shubby stylo) cv. Seca. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, Melbourne, v. 44, n. 1, p. 63-64, 1978.

REIF, J. C.; MELCHINGER, A. E; FRISCH, M. Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and bank management. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 1, p. 1-7, 2005.

REIS, M. S.; MARTINS, P. S. Determinação de parâmetros genéticos relacionados com a dormência das sementes de espécies de *Stylosanthes* Sw. **Ceres**, Viçosa, v. 33, n. 188, p. 363-371. 1986.

RIBEIRO, R. M. A. Glossário de termos de coleta e conservação de recursos genéticos. Ciência da Informação, Brasília: IBICT, v. 24, n. 3, 7 p. 1995. Disponível em: <<http://revista.ibict.br/ciinf/index.php/ciinf/article/view/499/453>>. Acesso em: 11 mai. 2004.

ROBINSON, P. J.; BURT, R.L.; WILLIAMS, W. T. Network analysis of genetic resources data. II. The use of isozyme data in elucidating geographical relationships. **Agro-ecosystems**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 111-118, 1980.

ROBINSON, P. J.; MEGARRITY, R. G. Characterization of *Stylosanthes* introductions by using seed protein patterns. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 26, n. 3, p. 467-479, 1975.

ROBLES, C. S.; CHIARI, L.; RESENDE, R. M. S.; JUNGSMANN, L.; LEGUIZAMON, G. O. C. Estudo da variabilidade genética em *Stylosanthes guianensis* usando marcadores microsatélites. In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE CORTE, 2. Campo Grande, 2006. **Anais...**Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006. 2 p. Disponível em <http://www.cnpqg.embrapa.br/eventos/2006/jornada2/TrabalhosProntos_Final_PDF/IC/ic1/008Roblescs.pdf>. Acesso em: 02 mai. 2007.

ROHLF, F. J. **NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1**. Setauket: Exeter Software, 2000. 38 p.

SACKVILLE HAMILTON, N. R.; ENGELS, J. M. M.; VAN HINTUM, T. J. L.; KOO, B. SMALE, M. **Accession management: combining or splitting accessions as a tool to improve germplasm management efficiency**. Roma: IPGRI, 2002. 66 p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 653 p.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT® 9.2 user's guide**. Cary: SAS Institute Inc., 2008. 7857 p. Disponível em <<http://support.sas.com/documentation/cdl/en/statug/59654/PDF/default/statug.pdf>>. Acesso em: 17 mai. 2008.

SARLE, W.S. **Cubic clustering criterion. SAS® technical report A-108**. Cary: SAS Institute Inc., 1983. 56 p.

SAWKINS, M. C.; MAASS, B. L.; PENGELLY, B. C.; NEWBURY, H.J.; FORD-LLOYD, B. V. MAXTED, N.; SMITH, R. Geographical patterns of genetic variation in two species of *Stylosanthes* SW. using amplified fragment length polymorphism. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v. 10, n. 8, p. 1947-1958, 2001.

SEDIYAMA, T.; CARDOSO, A. A.; VIEIRA, C.; ANDRADE, D. Taxa de hibridação natural em soja, em Viçosa e em Capinópolis, Minas Gerais. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 2, n. 94, p. 329-331, 1970.

SILVA, E. F. da; SILVA, L. M. da; MONTALVÁN, R. Crossing rate and distance in upland rice. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 2, p. 197-201, 2005.

SILVA, W. C. J. S. **Seleção de descritores mínimos e estabelecimento de coleções nucleares em *Capsicum* spp.** 138 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

SKALSKI, G. T.; COUCH, C. R.; GARBER, A. F.; WEIR, B. S.; SULLIVAN, C. V. Evaluation of DNA pooling for the estimation of microsatellite allele frequencies: a case study using striped bass (*Morone saxatilis*). **Genetics**, Maryland, v. 173, n. 2, p. 863-875, 2006.

SOUSA, F. B. de; ANDRADE, R. P. de; THOMAS, D. Estilosantes cv. Bandeirante: uma leguminosa forrageira para a Região dos Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 319-320, 1983a.

SOUSA, F. B. de; ANDRADE, R. P. de; THOMAS, D. Estilosantes cv. Pioneiro: uma leguminosa forrageira para os Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 321-322, 1983b.

SOUTHEDGE SEEDS. Nina and Temprano stylos – New legumes for tropical regions. Mareeba: Southedge seeds, set. 2003. (Quarterly Newsletter, 27). Disponível em <http://www.southedgeseeds.com.au/news/news_27.htm>. Acesso em: 20 out. 2006.

SOUZA, A. P. de. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. Cap. 29. p. 939-965.

SOUZA, F. D. de. Maturação e colheita de sementes de plantas forrageiras. **Revista brasileira de sementes**, Brasília, v. 3, n. 1, p. 143-157. 1981.

SPAIN, J. M. O uso de leguminosas herbáceas nas pastagens tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 9., 1988, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1988. p. 315-339.

SPAIN, J. M.; VILELA, L. Perspectivas para pastagens consorciadas na América Latina nos anos 90 e futuros. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. **Pastagens**. Piracicaba: FEALQ, p. 87-105. 1990

STACE, H. M. Breeding systems in *Stylosanthes*. I. Observations of outcrossing in *S. scabra* at an alcohol dehydrogenase locus. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 33, n. 1, p. 87-96, 1982.

STACE, H. M. Genetic systems in *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press Australia, 1984. p. 147-161.

STACE, H. M.; CAMERON, D. F. Cytogetics and the evolution of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press Australia, 1984. p. 49-72.

TAILLEBOIS, J.; GUIMARÃES, E. P. Improving outcrossing rate in rice (*Oryza sativa* L.). In: **Híbrido Rice**. Manila: International Rice Research Institute, 1988. p. 175-180.

TELLES, M. P. C.; SILVA, R. S. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G. DINIZ FILHO, J. A. F. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1387-1394, 2001.

THOMAS, D.; GROF, B. Some pastures species for the tropical savannas of South America. I. Species of *Stylosanthes*. **Herbage Abstracts**, Farnham Royal, v. 56, n. 10, p. 445-454, 1986.

TORGERSON, W. S. **Theory and methods of scaling**. New York: J. Wiley, 1958. 460 p.

TRONGKONGSIN, K.; HUMPHREYS, L. R. Simulated latitudinal effects on flowering and seed production of *Stylosanthes guianensis* selections. **Tropical Grasslands**, St. Lucia, v. 21, n. 2, p. 64-71, 1987.

VALLS, J. F. M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. Cap. 8. p. 281-342.

VALLS, J. F. M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1. Jaboticabal, 1988. **Anais...** Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1988. p. 106-128.

VANDER STAPPEN, J.; van CAMPENHOUT, S.; GAMA, S.; VOLCKAERT, G. Sequencing of the internal transcribed spacer region ITS1 as a molecular tool detecting variation in the *Stylosanthes guianensis* complex. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n. 6-7, p. 869-877, 1998.

VANDER STAPPEN, J., WELTJENS, I.; MUNAUT F., VOLCKAERT, G. Inter-specific and progeny relationships in the genus *Stylosanthes* inferred from chloroplast DNA sequences variation. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie**, Issy les Moulineaux, v. 322, n. 6, p. 481-490, 1999a.

VANDER STAPPEN, J.; WELTJENS, I.; VOLCKAERT, G. Microsatellite markers in *Stylosanthes guianensis*. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v. 8, n. 3, p. 514-517, 1999b.

van HINTUM, T. Molecular characterization of a lettuce germplasm collection. In: LEAFY VEGETABLES CONFERENCE 2003, Noordwijkerhout, 2003. **Proceedings...** Leiden: Eucarpia - European Association for Research on Plant Breeding, 2003. Disponível em <<http://www.leafyvegetables.nl/>> Acesso em: 04 jul. 2008.

van HINTUM, T.; van de WIEL, C. C. M.; VISSER, D. L.; van TREUREN, R.; VOSMAN, B. The distribution of genetic diversity in *Brassica oleracea* gene bank collection related to the effects on diversity of regeneration, as measured with AFLPs. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 5, p. 777-786, 2007.

van SLOTEN, D. H. The role of curators, breeders and others users of germplasm in characterization and evaluation of crop genetic resources. **IBPGR/SEAN**, Roma, Special Issue, p. 3-8, 1987.

VERNETTI, F. J.; BONATTO, E. R.; TERASAWA, F.; GASTAL, M. F. Observações sobre a taxa de cruzamentos naturais em soja, em Pelotas e Sertão, RS e Ponta Grossa, PR. **Ciência e Cultura**, São Paulo v. 1, n. 1, p. 36-41, 1972.

VIEIRA, M. L. C.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R de; MARTINS, P. S. A cytotoxic study in twelve Brazilian taxa of *Stylosanthes* Sw., Leguminosae. **Cytologia**, Tokyo, v. 58, n. 3, p. 305-311, 1993.

VIEIRA, M. L. C.; FUNGARO, M. H. P., JUBIER, M.F.; LEJEUNE, B. Determination of taxonomic relationships among Brazilian taxa of *Stylosanthes* SW., *Leguminosae*, using RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n. 3, p. 305-310, 1997.

VILELA, L. MACEDO, M. C. M.; MARTHA JÚNIOR, G. B.; KLUTHCOUSKI, J. Benefícios da integração lavoura-pecuária. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F. (Org.).

Integração lavoura-pecuária. 1 ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003, v. 1, p. 144-170.

VILELA, L.; MARTHA Jr., G. B.; BARIONI, L. G. Adubação na recuperação e na intensificação da produção animal em pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO DA PASTAGEM, 21., Piracicaba, 2004. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2004. p. 425-472.

WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. Herbários e coleta de germoplasma. In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 217-240.

WILLIAMS, M. J.; CHAMBLISS, C. G.; BROLMANN, J. B. Potential of 'Savanna' stylo as a stockpiled forage for the subtropical USA. **Journal of Production Agriculture.** Madison, v. 6, n. 4, p. 553-556, 1993.

WILLIAMS, R. J.; REID, R.; SCHULTZE-KRAFT, R. COSTA, N. M. S. THOMAS, B. D. Natural distribution of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes*.** North Ryde: Academic Press Australia, 1984. p. 73-101.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations. v. 4. Variability within and among natural populations.** Chicago: University of Chicago Press, 1978. 360 p.

YASSU, F.; CAMPOS, J. M. N. Leguminosa casa bem com capim. **DBO - A revista de negócios da pecuária,** São Paulo, v. 23, n. 281, p. 60-70, 2004.

YEE, E.; KIDWELL, K. K.; SILLS, G. R.; LUMPKIN, T. A. Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. **Crop Science,** Madison, v. 39, n. 1, p. 268-275, 1999.

ZHANG, J. Y.; YUAN, Q. H.; MENG, Y. Q.; LI, X. L.; NAN, Z. B.; WANG, Y. R.; ZHANG, W. S. A genetic diversity analysis of wild *Lespedeza* populations based on morphological characters, allozyme and RAPD methods. **Plant Breeding,** Berlin, v. 126, n. 1, p. 89-94, 2007.

ZHANG, X.; BLAIR, M. W.; WANG, S. Genetic diversity of Chinese common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces assessed with simple sequence repeats markers. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 117, n. 5, p. 629-640, 2008.

ANEXO

Anexo A. Relação dos acessos de *Stylosanthes guianensis*, com os respectivos dados das variedades botânicas e dos locais de coleta, utilizados nas caracterizações morfoagronômicas e moleculares, e os treze grupos de similaridade morfoagronômica, formados a partir da análise de agrupamento pelo método de Ward.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
135	<i>pauciflora</i>	BRA	Distrito Federal	X	1	X
210	<i>pauciflora</i>	BRA	Tocantins	X	1	X
381	-	BRA	Bahia	X	2	-
444	-	COL	Valle Del Cauca	X	3	-
461	-	BRA	Tocantins	X	4	-
464	-	BRA	Tocantins	X	2	X
465	-	BRA	São Paulo	X	5	X
517	-	BRA	Mato Grosso	X	2	X
540	-	-	-	X	1	-
648	<i>guianensis</i>	COL	Bogota	X	3	X
662	-	COL	Meta	X	3	X
664	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	6	X
665	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	6	X
666	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	7	X
680	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	6	-
684	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	8	-
1108	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	9	X
1109	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	8	X
1113	<i>pauciflora</i>	BRA	Maranhão	X	6	X
1114	<i>pauciflora</i>	BRA	Maranhão	X	8	X
1115	<i>pauciflora</i>	BRA	Maranhão	X	8	-
1116	<i>pauciflora</i>	BRA	Maranhão	X	8	-
1118	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	8	-
1119	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	1	X
1120	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	6	X
1121	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	8	X
1122	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	8	X
1123	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	7	X
1124	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	8	X
1125	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	8	X
1126	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	7	-
1128	<i>pauciflora</i>	VEN	Bolivar	X	6	X
1129	<i>pauciflora</i>	VEN	Bolivar	X	6	X
1130	<i>pauciflora</i>	BRA	Mato Grosso Sul	X	6	-
1131	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	9	X
1132	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	8	X
1133	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	8	X

Continua...

Anexo A. Cont.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
1134	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	8	X
1135	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	7	-
1136	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	6	X
1137	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	6	X
1138	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	7	X
1139	-	COL	Risaralda	X	2	X
1140	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	2	X
1141	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	9	X
1142	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	8	X
1143	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	6	X
1144	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	1	X
1145	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	8	X
1146	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	5	X
1147	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	6	X
1148	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	6	X
1149	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	7	X
1150	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	7	X
1151	<i>pauciflora</i>	VEN	Bolivar	X	8	X
1152	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	8	X
1153	-	BRA	Bahia	X	8	X
1154	<i>pauciflora</i>	BRA	Distrito Federal	X	8	-
1155	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	7	X
1156	<i>pauciflora</i>	BRA	Maranhão	X	7	X
1157	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	7	X
1229	<i>microcephala</i>	-	-	X	9	X
1230	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	X
1231	-	BRA	Minas Gerais	X	11	X
1232	-	BRA	Minas Gerais	X	12	X
1233	-	-	-	X	9	-
1234	-	-	-	X	6	X
1235	-	-	-	X	4	X
1236	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	X
1237	<i>canescens</i>	BRA	Tocantins	X	2	X
1238	<i>pauciflora</i>	BRA	Pará	X	6	X
1239	-	BRA	Pará	X	2	X
1329	<i>pauciflora</i>	BRA	Espirito Santo	X	9	X
1330	<i>pauciflora</i>	BRA	Espirito Santo	X	6	-
1331	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	6	X
1342	<i>microcephala</i>	BRA	Bahia	X	9	-
1343	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	4	X
1352	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	1	X
1353	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	X

Continua...

Anexo A. Cont.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
1354	<i>pauciflora</i>	BRA	Espirito Santo	X	6	X
1356	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	X
1360	<i>pauciflora</i>	BRA	Piauí	X	8	X
1362	<i>pauciflora</i>	BRA	Ceará	X	8	X
1365	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	6	X
1366	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	6	X
1368	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	3	X
1369	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	7	X
1371	<i>microcephala</i>	BRA	Goiás	X	9	X
1372	<i>pauciflora</i>	BRA	Pernambuco	X	9	X
1374	<i>pauciflora</i>	BRA	Pernambuco	X	1	X
1375	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	7	X
1380	-	BRA	Bahia	X	8	X
1381	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	6	X
1619	-	VEN	Monagas	X	6	X
1620	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	4	X
1621	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	6	-
1622	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	6	X
1623	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	6	X
1624	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	6	X
1625	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	7	X
1626	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	6	X
1627	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	7	X
1628	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	6	X
1629	<i>pauciflora</i>	VEN	Anzoategui	X	8	X
1631	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	-
1632	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	13	-
1635	<i>pauciflora</i>	BRA	Maranhão	X	6	X
2203	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	8	X
2204	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	-
2205	<i>pauciflora</i>	BRA	Alagoas	X	8	-
2206	<i>pauciflora</i>	BRA	Paráíba	X	9	-
2461	<i>guianensis</i>	BRA	Goiás	X	3	X
2462	<i>guianensis</i>	BRA	Mato Grosso	X	3	X
2463	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	3	X
2464	<i>guianensis</i>	BRA	Tocantins	X	13	X
2703	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	8	X
2704	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	8	X
2705	<i>pauciflora</i>	BRA	Piauí	X	6	X
2707	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	8	X
2708	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	8	X
2723	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	4	X

Continua...

Anexo A. Cont.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
2724	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	8	X
2725	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	4	X
2726	<i>pauciflora</i>	BRA	Paráiba	X	8	-
2727	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	7	X
2730	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	X
2731	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	8	-
2732	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	6	X
2733	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X		X
2734	<i>pauciflora</i>	BRA	Paráiba	X	9	X
2735	<i>pauciflora</i>	BRA	Alagoas	X	8	X
2736	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	1	X
2738	<i>pauciflora</i>	BRA	Ceará	X	8	X
2739	<i>pauciflora</i>	BRA	Tocantins	X	8	X
2740	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	4	X
2741	<i>pauciflora</i>	BRA	Alagoas	X	6	X
2742	-	BRA	Bahia	-	-	X
2743	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	6	X
2744	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	13	X
2745	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	8	X
2746	<i>pauciflora</i>	BRA	Tocantins	X	7	X
2747	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	11	X
2748	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	8	X
2749	<i>pauciflora</i>	BRA	Maranhão	X	8	X
2750	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	8	X
2752	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	1	X
2753	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	6	X
2755	<i>pauciflora</i>	BRA	Alagoas	X	8	X
2757	<i>pauciflora</i>	BRA	Maranhão	X	8	X
2758	<i>pauciflora</i>	BRA	Mato Grosso	X	10	X
2759	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	1	X
2760	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	1	X
2761	<i>pauciflora</i>	BRA	Distrito Federal	X	1	X
2762	<i>pauciflora</i>	VEN	Monagas	X	8	X
2763	-	BRA	Bahia	X	6	X
2764	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	1	-
2765	<i>pauciflora</i>	BRA	Piauí	X	8	X
2766	<i>pauciflora</i>	BRA	Distrito Federal	X	1	X
2767	<i>pauciflora</i>	BRA	Tocantins	X	6	X
2768	<i>pauciflora</i>	-	-	X	6	X
2769	<i>pauciflora</i>	BRA	Tocantins	X	8	-
2770	<i>pauciflora</i>	BRA	Tocantins	X	6	X
2771	<i>pauciflora</i>	BRA	Espirito Santo	X	6	X

Continua...

Anexo A. Cont.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
2772	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	6	X
2774	<i>pauciflora</i>	VEN	Carabobo	X	1	-
2775	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	7	X
2776	<i>pauciflora</i>	BRA	Distrito Federal	X	1	X
4122	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4142	<i>guianensis</i>	BRA	Tocantins	X	2	X
4143	<i>canescens</i>	BRA	Tocantins	X	5	X
4144	<i>canescens</i>	BRA	Tocantins	X	11	X
4145	<i>guianensis</i>	BRA	Tocantins	X	11	-
4157	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4160	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	-
4171	-	BRA	Goiás	X	2	X
4172	<i>canescens</i>	BRA	Goiás	X	2	X
4173	<i>canescens</i>	BRA	Tocantins	X	10	X
4174	-	BRA	Maranhão	X	2	X
4175	<i>canescens</i>	BRA	Tocantins	X	10	X
4176	<i>canescens</i>	BRA	São Paulo	X	5	X
4186	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	1	X
4187	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	1	X
4188	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	10	X
4189	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	11	X
4190	<i>pauciflora</i>	BRA	Ceará	X	8	X
4191	<i>pauciflora</i>	BRA	Ceará	X	1	X
4192	<i>guianensis</i>	BRA	Bahia	X	4	X
4193	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	4	X
4194	<i>pauciflora</i>	BRA	Distrito Federal	X	1	X
4195	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	X
4196	<i>pauciflora</i>	BRA	Maranhão	X	9	X
4197	-	BRA	Ceará	X	1	X
4198	<i>pauciflora</i>	BRA	Ceará	X	8	X
4199	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	4	X
4227	<i>canescens</i>	BRA	São Paulo	X	5	X
4229	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4230	<i>canescens</i>	BRA	São Paulo	X	5	X
4232	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4233	<i>canescens</i>	BRA	São Paulo	X	5	X
4234	<i>canescens</i>	BRA	Goiás	X	5	X
4235	<i>canescens</i>	BRA	São Paulo	X	5	X
4236	<i>guianensis</i>	BRA	São Paulo	X	5	X
4237	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4238	<i>guianensis</i>	BRA	Rio de Janeiro	X	5	X
4239	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	X

Continua...

Anexo A. Cont.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
4240	<i>guianensis</i>	BRA	Rio de Janeiro	X	11	X
4241	<i>guianensis</i>	BRA	Rio de Janeiro	X	5	X
4259	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
4260	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4261	<i>pauciflora</i>	BRA	Espirito Santo	X	3	X
4262	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4263	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	-
4264	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4265	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4267	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4268	<i>guianensis</i>	BRA	São Paulo	X	5	-
4274	<i>pauciflora</i>	BRA	São Paulo	X	5	X
4275	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4283	-	BRA	Goiás	X	9	X
4284	<i>microcephala</i>	BRA	Goiás	X	9	X
4285	<i>microcephala</i>	BRA	Goiás	X	9	X
4286	-	BRA	Goiás	X	2	X
4287	<i>pauciflora</i>	BRA	Distrito Federal	X	1	X
4288	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	-
4289	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	X
4290	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	X
4291	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	13	-
4292	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	4	X
4293	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	1	X
4294	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	X
4295	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	2	-
4296	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	6	X
4297	<i>pauciflora</i>	BRA	São Paulo	X	6	X
4298	<i>pauciflora</i>	BRA	São Paulo	X	8	X
4299	-	BRA	Minas Gerais	X	5	-
4300	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4301	-	BRA	São Paulo	X	5	X
4302	<i>microcephala</i>	BRA	Rio de Janeiro	X	2	X
4305	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	X
4306	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
4307	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
4308	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4309	<i>microcephala</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	-
4310	<i>microcephala</i>	BRA	Minas Gerais	X	9	-
4311	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
4312	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	13	X
4313	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X

Continua...

Anexo A. Cont.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
4314	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4315	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4316	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	-
4317	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	-	-	X
4318	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	-
4319	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4320	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	5	X
4321	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4322	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4323	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4324	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	13	X
4325	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4326	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4327	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4328	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4329	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4330	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	-
4331	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4332	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	-
4333	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	2	X
4334	-	BRA	São Paulo	X	5	-
4336	-	BRA	São Paulo	X	5	X
4337	-	BRA	São Paulo	X	5	X
4338	-	BRA	São Paulo	X	2	X
4339	-	BRA	São Paulo	X	12	X
4364	-	BRA	São Paulo	X	2	X
4528	-	-	-	X	2	X
4529	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
4530	<i>guianensis</i>	-	-	X	10	X
5187	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	4	X
5192	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5204	<i>canescens</i>	BRA	Goiás	X	13	X
5206	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
5213	<i>pauciflora</i>	BRA	São Paulo	X	13	X
5214	<i>canescens</i>	BRA	São Paulo	X	5	-
5215	<i>pauciflora</i>	BRA	São Paulo	X	13	X
5216	<i>canescens</i>	BRA	São Paulo	X	5	X
5218	<i>pauciflora</i>	BRA	São Paulo	X	5	-
5219	<i>pauciflora</i>	BRA	São Paulo	X	13	X
5220	<i>pauciflora</i>	BRA	São Paulo	X	13	X
5221	<i>canescens</i>	BRA	São Paulo	X	13	X
5223	<i>canescens</i>	BRA	São Paulo	X	13	-

Continua...

Anexo A. Cont.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
5224	<i>canescens</i>	BRA	São Paulo	X	5	X
5229	<i>canescens</i>	BRA	São Paulo	X	5	-
5230	<i>guianensis</i>	BRA	São Paulo	X	5	X
5233	<i>guianensis</i>	BRA	São Paulo	X	11	X
5235	<i>guianensis</i>	BRA	São Paulo	X	5	X
5236	<i>microcephala</i>	BRA	Minas Gerais	X	9	X
5237	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
5239	<i>microcephala</i>	BRA	Goiás	X	9	X
5247	<i>microcephala</i>	BRA	Goiás	X	9	X
5248	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	8	X
5249	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	8	X
5250	<i>pauciflora</i>	BRA	Mato Grosso do Sul	X	13	-
5254	<i>pauciflora</i>	BRA	Mato Grosso do Sul	X	13	X
5262	<i>microcephala</i>	BRA	Mato Grosso do Sul	X	13	X
5272	<i>pauciflora</i>	BRA	Mato Grosso do Sul	X	13	X
5277	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5279	<i>microcephala</i>	BRA	Minas Gerais	X	9	X
5282	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	3	-
5283	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	4	X
5286	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	X
5294	-	-	-	X	12	X
5295	-	-	-	X	9	X
5343	-	-	-	X	12	X
5349	-	BRA	Bahia	X	8	X
5352	-	BRA	-	-	-	X
1361-a	-	BRA	Pernambuco	X	8	X
5213a	-	BRA	São Paulo	X	13	X
5413	<i>pauciflora</i>	BRA	São Paulo	X	9	X
5414	-	BRA	São Paulo	X	13	-
5415	<i>guianensis</i>	BRA	Rio de Janeiro	X	11	-
5416	<i>guianensis</i>	BRA	Rio de Janeiro	X	6	X
5418	-	-	-	X	2	X
5419	-	-	-	X	1	X
5420	<i>guianensis</i>	-	-	X	10	X
5421	-	-	-	X	4	-
5422	-	-	-	X	9	X
5423	-	-	-	X	11	X
5424	-	-	-	X	3	-
5425	-	-	-	X	8	X
5426	-	-	-	X	10	X
5427	-	-	-	X	12	-
5428	-	BRA	Pará	X	2	X

Continua...

Anexo A. Cont.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
5429	-	BRA	Pará	X	13	X
5430	-	BRA	Maranhão	X	9	X
5431	-	BRA	Distrito Federal	X	9	X
5432	<i>microcephala</i>	BRA	Goiás	X	9	X
5433	<i>microcephala</i>	BRA	Tocantins	X	9	X
5434	-	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5435	-	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5436	-	BRA	Espirito Santo	X	12	X
5437	-	BRA	Bahia	X	10	X
5438	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	-
5439	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5440	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5441	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5442	-	BRA	Bahia	X	13	-
5443	-	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5444	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5445	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5446	-	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5447	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5448	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5449	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5450	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	-
5451	-	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5452	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	-
5453	-	BRA	Minas Gerais	X	13	-
5454	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	X
5455	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5456	-	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5457	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	-
5458	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	X
5459	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	-
5460	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
5461	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	-
5462	<i>canescens</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5463	-	BRA	Minas Gerais	X	12	-
5464	-	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5465	-	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5466	-	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5467	-	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5468	-	BRA	Minas Gerais	X	9	X
5469	-	BRA	Minas Gerais	X	9	X
5470	-	BRA	Minas Gerais	X	9	X

Continua...

Anexo A. Cont.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
5471	<i>microcephala</i>	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5472	-	BRA	Minas Gerais	X	9	X
5473	<i>microcephala</i>	BRA	Minas Gerais	X	9	X
5474	-	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5475	<i>microcephala</i>	-	-	X	9	X
5476	<i>microcephala</i>	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5477	<i>microcephala</i>	-	-	X	11	X
5478	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	-
5480	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5481	-	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5482	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5483	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5484	-	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5485	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	-
5486	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5487	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5488	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	9	X
5489	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5490	<i>microcephala</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5491	-	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5492	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	9	X
5493	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5494	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	6	-
5495	-	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5496	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5497	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	X
5498	-	-	-	X	12	-
5499	-	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5500	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5501	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5502	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	13	X
5503	-	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5504	-	BRA	Minas Gerais	-	-	X
5505	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5506	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5507	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	5	X
5508	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	-
5509	-	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5510	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5511	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5512	-	BRA	Minas Gerais	X	3	X
5513	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X

Continua...

Anexo A. Cont.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
5514	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5515	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5516	-	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5518	-	BRA	Minas Gerais	-	-	X
5519	-	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5520	-	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5521	-	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5522	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	-
5523	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	X
5524	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	11	-
5525	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	X
5526	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	X
5527	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	6	X
5528	-	BRA	Minas Gerais	X	10	-
5529	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5530	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5531	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	1	X
5532	-	BRA	Minas Gerais	X	10	X
5533	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5534	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	4	X
5535	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	11	-
5536	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	4	X
5537	-	BRA	Goiás	X	6	-
5538	-	BRA	Minas Gerais	X	4	X
5539	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	11	X
5540	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	3	X
5541	-	BRA	Minas Gerais	X	10	-
5542	<i>guianensis</i>	-	-	X	12	X
5543	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	X
5544	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	X
5545	-	BRA	Mato Grosso	X	6	X
5546	<i>canescens</i>	BRA	Mato Grosso	X	13	X
5547	<i>guianensis</i>	BRA	Mato Grosso	X	10	-
5449	-	-	-	X	13	X
5550	-	-	-	X	11	X
5551	-	-	-	X	12	X
5552	-	-	-	X	5	X
5553	-	-	-	X	10	X
5554	-	-	-	X	10	X
5555	-	-	-	X	12	X
5556	-	-	-	X	11	X
5557	-	-	-	X	1	-

Continua...

Anexo A. Cont.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
5558	-	-	-	X	13	-
5559	-	-	-	X	10	X
5560	-	-	-	X	12	X
5561	-	-	-	-	-	X
5562	-	-	-	X	13	X
5563	-	-	-	X	13	-
5564	-	-	-	X	13	X
5565	-	-	-	X	13	X
5566	-	-	-	X	9	X
5568	-	BRA	Minas Gerais	X	1	X
5569	-	-	-	X	13	X
5570	-	-	-	X	12	-
5571	-	-	-	X	1	X
5572	-	-	-	X	10	X
5573	-	-	-	X	12	X
5574	-	-	-	X	13	X
5575	-	-	-	X	1	X
5576	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	13	X
5577	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	12	-
5578	<i>guianensis</i>	BRA	Pará	X	13	-
5579	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	1	X
5580	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	6	X
5581	-	-	-	X	9	X
5582	-	-	-	X	2	X
5584	-	-	-	X	12	-
5585	-	-	-	X	2	X
5586	-	-	-	X	12	-
5587	-	BRA	Minas Gerais	X	4	X
5589	<i>pauciflora</i>	BRA	Minas Gerais	X	1	X
5590	-	BRA	Minas Gerais	X	3	X
5591	-	BRA	Minas Gerais	X	1	-
5592	-	BRA	Minas Gerais	X	6	X
5593	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	X
5594	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5595	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5596	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5597	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	12	X
5598	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	3	-
5599	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	4	X
5600	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	4	X
5601	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	3	X
5602	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	3	X

Continua...

Anexo A. Cont.

Nº CPAC	Variedade botânica	Local de Coleta		Caracterização morfoagronômica	Grupo morfoagronômico	Caracterização molecular
		País	Unidade federativa			
5603	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	10	X
5604	<i>pauciflora</i>	BRA	Tocantins	X	8	X
5606	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	6	X
5607	<i>pauciflora</i>	BRA	Bahia	X	6	X
5609	<i>guianensis</i>	BRA	Minas Gerais	X	3	X
5610	- ¹	-	-	X	1	-
5376	-	BRA	Goiás	X	9	X
5377	-	-	-	X	1	X
5378	-	BRA	Tocantins	X	11	X
5379	-	-	-	X	12	X
5380	-	BRA	Tocantins	X	10	X
5381	<i>microcephala</i>	BRA	Tocantins	X	8	X
5382	<i>microcephala</i>	BRA	Tocantins	X	9	X
5383	<i>microcephala</i>	BRA	Tocantins	X	9	X
5384	<i>microcephala</i>	BRA	Tocantins	X	9	X
5385	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	1	X
5386	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	1	X
5387	-	-	-	X	9	X
5388	-	-	-	X	9	X
5389	-	-	-	X	1	X
5390	-	-	-	X	1	X
5391	-	-	-	X	1	-
5392	-	-	-	X	1	X
5393	-	-	-	X	1	X
5394	-	-	-	X	10	-
5395	-	-	-	X	11	-
5396	-	-	-	X	1	-
5398	-	-	-	X	6	-
5399	-	-	-	X	6	-
5400	-	-	-	X	6	-
5401	<i>pauciflora</i>	BRA	Goiás	X	11	-
5402	<i>guianensis</i>	BRA	Goiás	X	11	-
5403	<i>canescens</i>	BRA	Mato Grosso	X	13	-
5404	<i>guianensis</i>	BRA	Mato Grosso	X	12	-
5405	<i>pauciflora</i>	BRA	Mato Grosso	X	11	-
5406	<i>guianensis</i>	BRA	Mato Grosso	X	2	-
5407	<i>microcephala</i>	BRA	Mato Grosso	X	9	-
5408	<i>microcephala</i>	BRA	Maranhão	X	9	-
5409	-	-	-	X	3	-
5410	-	-	-	X	1	-
5411	-	-	-	X	13	-
5412	-	-	-	X	13	-

¹ Dados não disponíveis ou não coletados.