

VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Pennisetum purpureum* Schumacher¹

MARCELO CAVALCANTE^{2*}, MÁRIO DE ANDRADE LIRA³

RESUMO - O conhecimento sobre a magnitude da variabilidade genética de uma coleção é de grande importância para o sucesso e longevidade dos programas de melhoramento. Alguns autores afirmam existir variabilidade genética em capim elefante (*Pennisetum purpureum*), sendo esta ampliada com o uso do milho (*P. glaucum*) nos programas de hibridação. Neste trabalho são apresentadas considerações sobre variabilidade genética no germoplasma de capim elefante, bem como as principais metodologias empregadas para avaliar a magnitude desta variabilidade. Considerando os trabalhos pesquisados, as metodologias aplicadas (componentes principais, variáveis canônicas, métodos aglomerativos, baseados nas distâncias euclidianas ou de Mahalanobis; índice de Jaccard e métodos de agrupamento, baseados nas distâncias de Ney & Li) foram eficientes em determinar a variabilidade genética, sendo esta de alta magnitude na maioria dos genótipos estudados no Brasil e em outros países, tanto em nível biométrico quanto em nível molecular, podendo ser explorada por programas de melhoramento através de métodos de seleção ou de hibridações intra e interespecíficas.

Palavras-chave: Divergência genética. Marcadores morfológicos. Marcadores enzimáticos. Marcadores de DNA.

GENETIC VARIABILITY IN *Pennisetum purpureum* Schumacher

ABSTRACT - The knowledge about the magnitude of the genetic variability of collection is great importance to the success and longevity of plant breeding programs. Some authors affirm to exist genetic variability in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), being expanded with the use of millet (*P. glaucum*) in the hybridization. This work presents considerations on genetic variability in elephant grass germplasm and the main methodologies used to assess this variability. Based on the works studied, the methodologies (principal component, canonical variables and agglomerative methods, based in the euclidian and Mahalanobis distances; Jaccard' index and cluster' methods, based in the Ney & Li distances) were efficient in to determine the genetic variability in most genotypes studies in Brazil and other countries, both biometric and molecular level, way be exploited by breeding programs through methods of selection intra and interspecific hybridizations.

Keywords: Genetic divergence. Morphological markers. Enzymatic markers. DNA markers.

*Autor para correspondência.

¹Recebido para publicação em 24/07/2009; aceito em 10/06/2010.

²Departamento de Zootecnia, UFRPE, 52171-900, Recife - PE; marcelo.agronomia@gmail.com

³Instituto Agronômico de Pernambuco, IPA, 50761-000, Recife - PE; mariolira@terra.com

INTRODUÇÃO

O gênero *Pennisetum* sp. pertencente à família Poaceae é constituído por mais de 140 espécies, destacando-se o capim elefante (*P. purpureum* Schumacher) por apresentar grande importância forrageira (elevada produtividade, palatabilidade, persistência), além de ser adaptado a quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (FERREIRA; PEREIRA, 2005). É uma espécie que pode ser cultivada sob as formas de capineira ou pastejo (PEREIRA et al., 2008), podendo ainda ser cultivada em consórcio com leucena [*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit.] (CARNEIRO et al., 2006).

O capim elefante é uma espécie alógama que apresenta ampla variabilidade genotípica para a maioria das características de importância agrônoma/zootécnica, sendo esta variabilidade distribuída no germoplasma que é composto por grande número de acessos (PEREIRA et al., 2000).

Na evolução das espécies cultivadas, além das mutações e poliploidia, as hibridações interespecíficas também foram importantes na ampliação da base genética (FERREIRA, 2006). Diante disto, considerando a relativa facilidade com que o capim elefante e milheto [*P. glaucum* (L.) R. Brown] se cruzam é possível utilizar o germoplasma do milheto ($2n = 2x = 14 =$ genoma AA) no melhoramento do capim elefante ($2n = 4x = 28$, genomas A'A'BB). Deste cruzamento, surge um híbrido triplóide ($2n = 3x = 21$, genomas AA'B), estéril, que morfologicamente se assemelha ao capim elefante e que apresenta algumas características intermediárias entre as duas espécies (JAUHAR; HANNA, 1998). Contudo, pela indução de poliploidia cromossômica deste híbrido por meio de antimitóticos, pode-se gerar um híbrido hexaplóide sintético ($2n = 6x = 42 =$ genomas AAA'A'BB), fértil, com alta frequência de pólen viável [chegando a 86% no híbrido americano "Paraíso", a partir da germinação *in vitro* (PAIVA, 2006)], sementes de maior tamanho e com menor deiscência, quando comparadas às do capim elefante, e que viabilizam a propagação deste híbrido via semente (ABREU et al., 2006).

De acordo com Ferreira e Pereira (2005), os híbridos triplóides e hexaplóides são importantes fontes de variação para seleção de novos genótipos superiores, observando-se grande variabilidade para caracteres de importância forrageira. Do ponto de vista de que a seleção de genótipos só pode atuar efetivamente sobre diferenças herdáveis e que a mesma não pode criar variabilidade genética, apenas atuar sobre a já existente (ALLARD, 1971), os programas de melhoramento devem dispor de uma coleção heterogênea geneticamente, a fim de selecionar e criar combinações híbridas superiores às gerações segregantes.

A caracterização e a avaliação da variabilidade genética constituem ferramentas indispensáveis aos trabalhos ligados ao melhoramento de plantas.

Para isso, o melhorista lança mão de vários métodos de análises de dados, onde a escolha do mais adequado deverá ser realizada em razão de princípios, como o nível de precisão desejada, da facilidade de análise, da forma com que os dados foram obtidos e da natureza dos caracteres avaliados (CRUZ, 2005).

A análise multivariada, onde diversos caracteres podem ser dimensionados simultaneamente, apresenta-se como muito vantajosa na identificação da variabilidade genética (MOURA et al., 1999). Dentre as técnicas, a distância generalizada de Mahalanobis, a análise de variáveis canônicas e a análise de componentes principais são comumente utilizadas para dados fenotípicos (CRUZ; REGAZZI, 1997).

Não somente variáveis quantitativas podem ser utilizadas na avaliação da variabilidade genética. Os marcadores morfológicos (cor, cerosidade, pilosidade, entre outros) são descritores bastante acessíveis e podem ser utilizados na avaliação da divergência genética do germoplasma. Estes, por se tratarem de caracteres qualitativos, geralmente governados por poucos genes e serem de alta herdabilidade, é comum a avaliação em poucos indivíduos (WOUW et al., 1999).

O uso de marcadores enzimáticos e de DNA (ácido desoxirribonucléico) vêm sendo empregado com grande sucesso em diversos trabalhos nos quais se estuda a diversidade de uma coleção, bem como na identificação de duplicatas nos bancos de germoplasmas.

No Brasil são poucas as instituições de pesquisa que atuam no melhoramento do capim elefante, destacando-se a Embrapa Gado de Leite (CNPGL) e o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) conveniado com a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Estas empresas, nos últimos anos desenvolveram significativo número de genótipos a partir de cruzamentos intra e interespecíficos que se encontram em fase avançada de melhoramento (fases 2 e 3 citadas por FERREIRA; PEREIRA, 2005).

Esta revisão objetiva apresentar considerações sobre variabilidade genética no germoplasma de capim elefante e as principais metodologias empregadas para avaliar a magnitude desta variabilidade.

Origem, distribuição e variabilidade no germoplasma de capim elefante

O capim elefante é uma gramínea que ocorre naturalmente em uma extensa área da África Ocidental, sendo este apontado como o centro de origem e de variabilidade genética desta espécie. Os territórios da Guiné, Moçambique, Angola, Zimbábue e sul do Quênia são relacionados como as principais áreas de biodiversidade desta forrageira (FERREIRA; PEREIRA, 2005) (Figura 1).

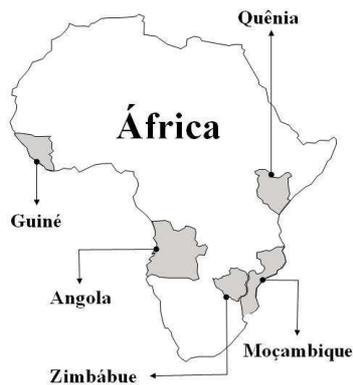


Figura 1. Pools gênicos de capim elefante em seu centro de biodiversidade: Guiné, Angola, Zimbábue, Moçambique e Quênia.

O descobrimento e a divulgação do capim elefante como planta forrageira foram feitos pelo coronel Napier Springer, que o recomendou ao Departamento de Agricultura da Rodésia (atual *Department of Agricultural Research & Extension Services of Zimbabwe*), sendo avaliado com sucesso por volta de 1910. Sua introdução nas Américas foi iniciada em 1913, nos Estados Unidos pelo Departamento de Agricultura (*United States Department of Agriculture - USDA*), expandindo-se pelas Américas Central e do Sul. O capim elefante foi introduzido em Cuba em 1917 (GUERRA, 2002), chegando ao Brasil em 1920 e 1921 pelos Estados do Rio Grande do Sul e São Paulo, a partir de mudas trazidas dos Estados Unidos e de Cuba, respectivamente.

A partir das primeiras cultivares (Napier e Mercker) e de novas introduções, desenvolveu-se grande número de genótipos por meio de cruzamentos que se encontram hoje distribuídos por quase todo território brasileiro, dada às ótimas condições edafoclimáticas encontradas neste país para o cultivo desta espécie (Figura 2) (DAHER et al., 2002).

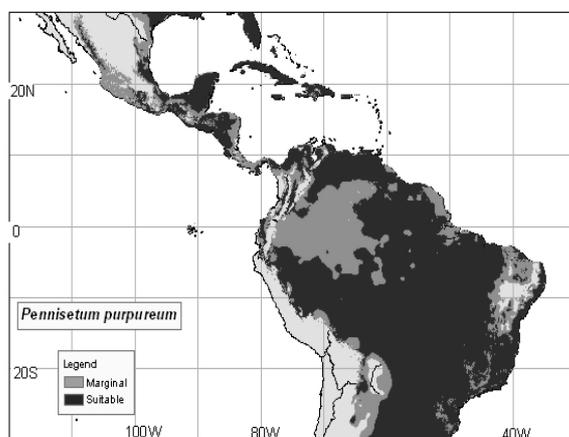


Figura 2. Condições edafoclimáticas do Brasil consideradas favoráveis (preto), propícias (cinza-escuro) e desfavoráveis (cinza-claro) ao cultivo de capim elefante. Fonte: Adaptado de Tropical Forages (2010).

Segundo Pereira (1992), considerando-se um conjunto de caracteres diferenciadores, pode-se classificar a variabilidade dentro do germoplasma de capim elefante em cinco grupos distintos, definidos em relação aos tipos básicos, descritos a seguir:

I) *Grupo Cameroon*: apresenta genótipos com touceiras densas, porte ereto, colmos grossos, predominância de perfilhos basais, folhas largas e florescimento tardio, tendo como representantes algumas de suas cultivares mais conhecidas a Cameroon, Cameroon Piracicaba, Vruckwona, capim Cana D'África;

II) *Grupo Napier*: apresenta genótipos com touceiras abertas, colmos grossos, folhas largas e época de florescimento intermediária, sendo representado pelas cultivares mais conhecidas Napier, Mineiro, Taiwan A-146;

III) *Grupo Mercker*: apresenta genótipos de menor porte, colmos finos, folhas finas e mais numerosas, e época de florescimento precoce, destacando-se as cultivares Mercker México, Elefante B e Mercker Pinda;

IV) *Grupo anão*: suas principais características são o porte baixo (até 1,5 m de altura) e a sua elevada relação folha/colmo (entrenós curtos), tendo a cultivar *Mott* como principal representante. Não existem informações publicadas sobre os genes responsáveis pela altura da planta para o capim elefante. Contudo, o caráter anão (*dwarf*) parece está relacionado a alelos recessivos. Em milho, os alelos *dl* inibem três etapas de biossíntese do hormônio giberelina (responsável pela altura das plantas), exibindo o fenótipo característico deste grupo (SRAY et al., 1996);

V) *Grupo dos híbridos interespecíficos*: é composto por genótipos que resultaram do cruzamento entre espécies de *Pennisetum*, principalmente, *P. purpureum* e *P. glaucum*. Destacam-se as cultivares capim elefante Paraíso (híbrido hexaplóide), e os híbridos triplóides Mineiro x 23A (milheto), Napier x 23A e o HV-241 (Elefante B x 23A).

A variabilidade genética pode ser estimada por várias técnicas, sendo cada uma baseada em caracteres qualitativos, quantitativos ou moleculares. Quando a avaliação da variabilidade for baseada no fenótipo, são utilizados modelos estatísticos em que se consideram os marcadores morfológicos e/ou agrônômicos. Quando se avalia em nível molecular, utilizam-se dados binários (presença ou ausência de bandas). Independente da técnica utilizada, são geradas medidas de similaridade ou dissimilaridade, podendo-se com isto, estimar a variabilidade genética da coleção.

Uso de modelos biométricos na avaliação da variabilidade genética

Os principais modelos biométricos empregados na avaliação da variabilidade genética em capim elefante e híbridos intra e interespecíficos estão embasados na genética mendeliana (caracteres qualitativos ou descontínuos) e genética quantitativa

(caracteres contínuos), que é quantificada por uma medida de dissimilaridade.

Na determinação da variabilidade genética, vários modelos multivariados podem ser aplicados, entre os quais a análise dos componentes principais, variáveis canônicas e os métodos aglomerativos. Os métodos que se baseiam na análise dos componentes principais (ACP) e variáveis canônicas (VC) permitem o estudo da divergência genética em gráficos de dispersão, em que se consideram, em geral, dois eixos cartesianos. Os métodos aglomerativos diferem dos demais em razão de dependerem de medidas de dissimilaridade estimadas previamente, como a distância euclidiana (d_e) e a distância generalizada de Mahalanobis (D^2), segundo Cruz (2005).

Tcacenco e Lance (1992) avaliaram 89 descritores morfológicos e biométricos em nove acessos de capim elefante nos estádios vegetativo e reprodutivo em Itajaí/SC. Estes autores encontraram baixa divergência genética (57%) entre os genótipos quando considerados os caracteres reprodutivos. Como a ACP permite o descarte de variáveis que pouco contribuem para divergência genética, das 25 variáveis estudadas, os autores destacaram o diâmetro do colmo, comprimento da bainha e da lâmina da 3ª folha, largura da lâmina da 5ª folha e diâmetro da raques como aquelas que produzem boa separação entre os nove acessos. Com a redução do número de variáveis, os dois primeiros componentes principais (CP) explicaram 86% da variação total (Figura 3).

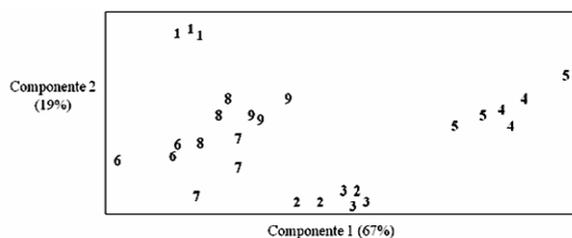


Figura 3. Diagrama de dispersão de nove acessos de capim elefante plotado contra os dois primeiros componentes principais a partir de caracteres reprodutivos. 1: EMPASC 308-Liso; 2: EMPASC 308-Vale; 3: Taiwan A-148; 4: EMPASC 307-Testo; 5: Cameroon; 6: Taiwan A-143; 7: EMPASC 309-Areia; 8: Duro Volta Grande; 9: Albano. Fonte: Tcacenco e Lance (1992).

Considerando estas variáveis, foi realizada a análise de agrupamento com base na distância euclidiana como medida de dissimilaridade, sendo formados quatro grupos (Figura 4), evidenciando alta similaridade dentro do grupo e alta dissimilaridade genética entre grupos.

Avaliando os caracteres vegetativos, os dois componentes principais explicaram 95% da variabilidade total. Desta forma, os autores concluíram que existe variabilidade genética entre os acessos de capim elefante quanto aos caracteres vegetativos e reprodutivos, destacando-se os caracteres diâmetro do colmo e dos nós; comprimento da folha; pubescência

das folhas; tamanho, cor e pubescência da ligula; e rugosidade da margem da folha, por explicar, em grande parte, a variabilidade entre os genótipos de capim elefante. Os autores destacaram a cultivar Cameroon e o acesso EMPASC 307-Testo como os genótipos com maior variabilidade.

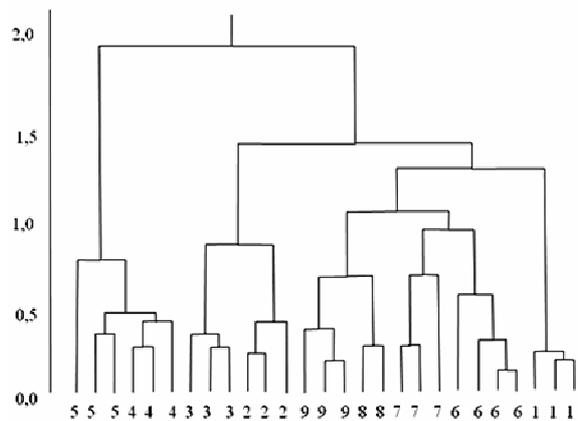


Figura 4. Dendrograma resultante da análise de agrupamento de nove acessos de capim elefante usando nove caracteres morfológicos, com base na distância euclidiana como medida de dissimilaridade. 1: EMPASC 308-Liso; 2: EMPASC 308-Vale; 3: Taiwan A-148; 4: EMPASC 307-Testo; 5: Cameroon; 6: Taiwan A-143; 7: EMPASC 309-Areia; 8: Duro Volta Grande; 9: Albano. Fonte: Tcacenco e Lance (1992).

Wouw et al. (1999) utilizando a mesma metodologia de Tcacenco e Lance (1992), avaliaram 53 acessos de *P. purpureum* e híbridos interespecíficos em Debre Zeit, Etiópia, a partir de oito caracteres agrônômicos e 20 morfológicos. Para os caracteres agrônômicos, foram formados cinco grupos distintos cujos dois primeiros CP explicaram 73% da variabilidade total. A variabilidade encontrada nos caracteres morfológicos foi de 51% nos dois primeiros CP, sendo formados seis grupos pelo método de agrupamento. As variáveis altura das plantas, diâmetro do colmo, pilosidade das folhas e da bainha foliar foram as que mais contribuíram para a variabilidade entre os genótipos. Os autores destacaram a alta similaridade entre alguns acessos, podendo ser o caso de duplicatas na coleção. Para ser comprovada esta hipótese, deve-se lançar mão dos marcadores de DNA, revelando, desta forma, uma limitação dos modelos biométricos como ferramenta para se determinar a ocorrência de duplicatas. O acesso 16621 foi o mais divergente por apresentar hábito rizomatoso (11,7 rizomas) e pequenas folhas (52,0 cm).

Daher et al. (2000), a partir de oito caracteres, avaliaram a divergência genética entre 17 genótipos de capim elefante (15 híbridos intra-específicos e duas cultivares) em Campo dos Goytacazes/RJ, por meio de variáveis canônicas (VC). Os autores observaram um total de 80,70% da variação nas duas primeiras VC, considerando-se esta variação satisfatória

para inferência da divergência genética entre os genótipos. O diâmetro do colmo apresentou o maior coeficiente de ponderação, sendo o principal fator de discriminação entre os genótipos no plano bidimensional, seguido da altura das plantas na época das águas e na época das secas (Figura 5). A cultivar Pioneiro e o híbrido CNPGL 91 F27-5 formaram o grupo mais dissimilares, por apresentarem alta produtividade (4.163 e 4.725 kg ha⁻¹, respectivamente), alta altura (2,09 e 2,06 m, respectivamente), reduzido diâmetro do colmo (10,3 e 10,2 mm, respectivamente) e elevado número de perfilhos (27 perfilhos/m cada).

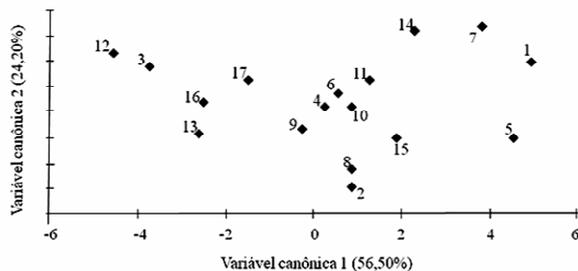


Figura 5. Diagrama de dispersão de 17 genótipos de capim elefante plotado contra as duas primeiras variáveis canônicas a partir de oito caracteres da planta. 1: CNPGL 91 F27-5; 2: CNPGL 91 F11-2; 3: Pioneiro; 4: CNPGL 91 F06-3; 5: CNPGL 91 F25-3; 6: Taiwan A-146; 7: CNPGL 91 F34-1; 8: CNPGL 91 F02-5; 9: CNPGL 91 F02-4; 10: CNPGL 91 F17-5; 11: CNPGL 91 F19-1; 12: CNPGL 91 F10-5; 13: CNPGL 91 F28-1; 14: CNPGL 91 F01-2; 15: Mineiro; 16: CNPGL 91 F13-2; 17: CNPGL 91 F10-2. Fonte: Daher et al. (2000).

Cruz e Regazzi (1997) recomendaram mais de 80% da variância total para os dois primeiros CP ou para as duas primeiras VC para inferência da divergência genética. Levando-se em consideração este critério, pôde-se observar baixa divergência genética entre os genótipos avaliados por Wouw et al. (1999) e elevada divergência dos genótipos avaliados por Tacenco e Lance (1992) e Daher et al. (2000).

Com o objetivo de avaliar a existência de variabilidade genética em caracteres bromatológicos das folhas (matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido) de genótipos de *Pennisetum* sp. em função da idade das plantas, Pereira et al. (2000) utilizaram o método aglomerativo (método de agrupamento de Tocher), tendo-se a D² como medida de dissimilaridade. Para cada idade avaliada, foram obtidos três grupos, sendo que em todas as épocas permaneceram dentro de um mesmo agrupamento as cultivares Mineiro, Mercker e King Grass e, em outro, Taiwan A-146 e Roxo (Tabela 1).

Segundo os autores, a presença de cultivares dentro de um mesmo grupo significa que as mesmas apresentam similaridade genética entre si para os caracteres estudados, sendo que a permanência do agrupamento entre idades demonstra que houve boa

consistência na estimativa da distância genética entre as cultivares e que as características discriminantes foram pouco influenciadas pela variação ambiental (idades). O híbrido interespecífico Mercker x 23A se diferenciou dos demais genótipos, formando um grupo único e isolado em todas as épocas estudadas (Tabela 1). Este híbrido apresentou baixo teor de matéria seca (21% aos 60 dias), elevado teor de proteína bruta (24% aos 30 dias), baixo teor de fibra em detergente neutro (66% aos 90 dias) e de fibra em detergente ácido (37% aos 90 dias) em comparação aos demais genótipos, destacando o progresso que pode ser alcançado no melhoramento do capim elefante para estas características.

Shimoya et al. (2002) avaliaram o grau de divergência genética entre 99 genótipos de capim elefante em Coronel Pacheco/MG, a partir de 17 caracteres quantitativos utilizando a técnica de agrupamento de Tocher (D² como medida de dissimilaridade) e de variáveis canônicas (por meio dispersão gráfica). Foi observada a formação de 18 grupos entre os 99 genótipos avaliados (Tabela 2), sendo o agrupamento 1 o mais numeroso, com 44 genótipos, indicando alta similaridade entre os genótipos deste agrupamento, podendo ser o caso de duplicados no banco de germoplasma (BAG).

As duas primeiras VC absorveram 50,0% da variância total (Figura 6), indicando que há baixo grau de divergência genética entre os genótipos, considerando os critérios estabelecidos por Cruz e Regazzi (1997). Os genótipos G72 e G76 foram os mais similares, e os genótipos G40 e G86 foram os mais divergentes. Os autores indicaram vários cruzamentos envolvendo a testemunha (cultivar Pioneiro, código G98) e os genótipos promissores divergentes, visando ao aumento da relação folha/colmo (genótipos G74, G86, G10, G53, G56, G59 e G65), ao aumento do número de sementes (genótipos G6, G10, G13, G18, G20, G43, G50, G60, G94 e G71) e a redução do ângulo de inserção das folhas (genótipos G74, G86, G10, G36, G56, G59, G65). O diâmetro do colmo é uma variável importante para discriminação dos genótipos.

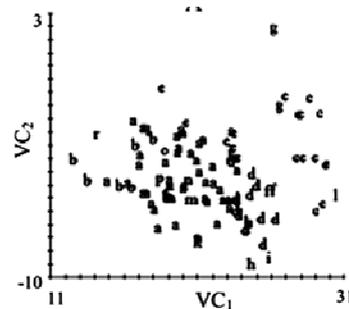


Figura 6. Diagrama de dispersão de 99 genótipos de capim elefante plotado contra as duas primeiras variáveis canônicas a partir de 17 caracteres da planta. Grupos a: 44 genótipos; b, c: 8 genótipos cada; d: 13 genótipos; e: 6 genótipos; f, g, h: 2 genótipos cada; i, j, k, l, m, n, o, p, q, r: 1 genótipo cada. Fonte: Shimoya et al. (2002).

Tabela 1. Agrupamento dos genótipos de capim elefante^a avaliados aos 30, 45, 60, 75 e 90 dias de idade, utilizando o método de Tocher.

Grupos	30 dias	45 dias	60 dias	75 dias	90 dias
I	6	1; 3; 5; 7; 11	4, 5, 9	5, 7, 8, 10	1, 2, 3, 5, 7, 8, 11
II	4; 5; 9	2; 4; 8; 9; 10	1, 2, 3, 7, 8, 10, 11	1, 2, 3, 4, 9, 11	6
III	1; 2; 3; 7; 8; 10; 11	6	6	6	4, 9, 10

a) 1: Mineiro; 2: Napier; 3: Mercker; 4: Taiwan A-146; 5: Cameroon Piracicaba; 6: Mercker x 23A (milheto); 7: Napier x 23A; 8: Mineiro x 23A; 9: Roxo; 10: Mott; 11: King Grass. Fonte: Pereira et al. (2000).

Tabela 2. Grupos de similaridade genética entre 99 genótipos de capim elefante estabelecidos pelo método de Tocher, a partir da distância generalizada de Mahalanobis.

Grupo	Genótipos
1	72, 76, 69, 51, 32, 31, 30, 22, 25, 28, 96, 44, 92, 83, 15, 88, 9, 29, 11, 14, 24, 27, 54, 75, 64, 87, 91, 94, 95, 23, 33, 70, 35, 57, 77, 42, 78, 17, 34, 48, 1, 45, 21 e 7
2	40, 85, 39, 84, 82, 81, 67 e 38
3	66, 74, 52, 65, 61, 55, 58, 68, 60, 63, 89 e 37
4	8, 50, 5, 4, 13, 12, 18, 20, 43, 19, 10, 59 e 3
5	26, 90, 99, 93, 98 e 16
6	2 e 6
7	47 e 49
8	36 e 53
9	73
10	62
11	71
12	86
13	97
14	79
15	41
16	80
17	56
18	46

Fonte: Shimoya et al. (2002).

Wouw et al. (1999) afirmaram que a caracterização morfológica e agrônômica não foram eficientes em separar todos os híbridos interespecíficos dos não-híbridos. Afirmaram ainda que a caracterização molecular foi ineficiente em discriminar acessos de porte alto e baixo, denotando a importância da integração entre as metodologias. Lowe et al. (2003) e Pereira et al. (2008) corroboraram com esta afirmativa.

Uso de marcadores moleculares na avaliação da variabilidade genética

Os pesquisadores têm tradicionalmente selecionado variabilidade com base no fenótipo. Esta estratégia tem sido de sucesso para características de alta herdabilidade (h^2), mas nem sempre para caracteres de baixa h^2 . Pelo fato de a maioria das características selecionadas no melhoramento de plantas

serem de natureza quantitativa, estas sofrem os efeitos da interação genótipo x ambiente ($G \times E$), que pode mascarar o fenótipo. Uma forma de evitar este problema seria selecionar indivíduos superiores com base no genótipo, pois este independe do ambiente e não muda durante o ciclo de vida de um indivíduo (MILACH, 1998).

Ferreira e Grattapaglia (1996) definiram marcador molecular como sendo todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas ou de um segmento específico de DNA. Para Milach (1998), marcadores moleculares são características do DNA que diferencia dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente.

O uso de marcadores moleculares representa uma ferramenta adicional em programas de melhoramento genético, oferecendo novas possibilidades no manejo do BAG, permitindo a comparação entre indivíduos, identificando duplicatas, além de possibilitar a classificação do germoplasma em grupos de

interesse para os diferentes programas de melhoramento. Permite também determinar a presença ou ausência de genes ligados a características específicas, com a vantagem de se fazer as análises antes de o material ser levado para o campo. Com isso, diminui-se o número de genótipos que necessitaria de manejo (adubação, irrigação, capina, etc.), havendo redução no número de gerações de melhoramento necessárias no desenvolvimento de cultivares (MOREIRA, 2010).

Atualmente há inúmeros tipos de marcadores moleculares, diferenciando-se quanto à habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade.

Padrões isoenzimáticos

Marcadores baseados em proteínas e isoenzimas (também chamados de marcadores bioquímicos) passaram a ser efetivamente utilizados na identificação da variabilidade genética na década de 70. O uso desses representou um avanço para o melhoramento de plantas, não apenas na caracterização de cultivares, mas também porque possibilitou a obtenção de distâncias genéticas entre genótipos e, assim, a estimativa da variabilidade existente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Isoenzimas são formas de enzimas com função catalítica similar diferindo na seqüência de aminoácidos. O princípio básico da técnica consiste na utilização de eletroforese em gel de amido e na visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos. É uma técnica de fácil manipulação, baixo custo e permite analisar vários sistemas isoenzimáticos e grande número de indivíduos (MILACH, 1998).

Freitas et al. (2000) avaliaram a diversidade genética entre 14 genótipos de *Pennisetum* sp. [sete cultivares

(Mole de Volta Grande, Australiano, Cameroon, Gramafante, Venezuela Elefante Roxo e Elefante B) e sete híbridos interespecíficos (HV-204, HV-241, HV-268, HV-281, HV-290, HV-400 e HV-296)] utilizando os sistemas enzimáticos fosfatase ácida (ACP), glutamato oxalacetato transaminase (GOT), peroxidase e esterase (EST) obtidas a partir de tecidos foliares com 28 dias após corte de uniformização em Vitória de Santo Antão/PE. Na Figura 7 estão apresentados os zimogramas dos sistemas enzimáticos estudados, indicando elevada variabilidade quanto ao número de bandas: três para GOT, nove para ACP, 13 para POX e 19 para EST.

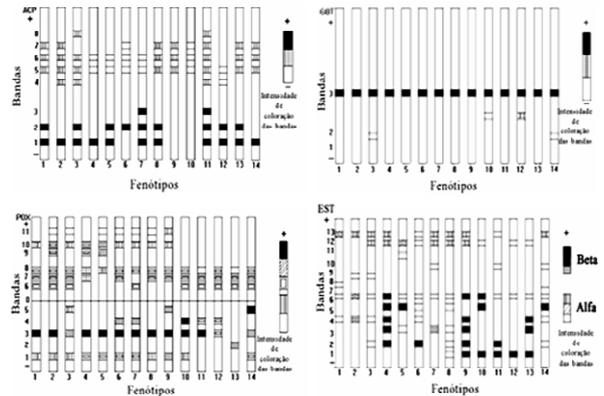


Figura 7. Zimogramas resultante da análise de tecidos foliares de 14 genótipos de capim elefante quanto aos sistemas enzimáticos fosfatase ácida (ACP), glutamato oxalacetato transaminase (GOT), peroxidase (POX) e esterase (EST) (1: Mole de Volta Grande; 2: Australiano; 3: HV-204; 4: HV-241; 5: HV-268; 6: HV-281; 7: HV-290; 8: HV-400; 9: HV-296; 10: Cameroon; 11: Gramafante; 12: Venezuela; 13: Elefante Roxo; e 14: Elefante B). Fonte: Freitas et al. (2000).

Tabela 3. Grau de similaridade genética entre sete cultivares de capim elefante e sete híbridos interespecíficos, selecionados para o semi-árido de Pernambuco, obtidos por padrões eletroforéticos de fosfatase ácida, glutamato oxalacetato transaminase, peroxidase e esterase, utilizando-se o Índice de Jaccard.

Genótipos*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0,70	0,58	0,48	0,45	0,62	0,55	0,59	0,45	0,43	0,52	0,43	0,50	0,59
2	-	0,63	0,55	0,48	0,57	0,50	0,54	0,52	0,39	0,48	0,39	0,43	0,54
3	-	-	0,44	0,46	0,56	0,54	0,58	0,48	0,33	0,48	0,44	0,38	0,58
4	-	-	-	0,55	0,52	0,48	0,52	0,67	0,43	0,35	0,30	0,40	0,43
5	-	-	-	-	0,50	0,57	0,62	0,39	0,36	0,29	0,36	0,36	0,34
6	-	-	-	-	-	0,57	0,71	0,62	0,48	0,48	0,39	0,39	0,45
7	-	-	-	-	-	-	0,57	0,71	0,39	0,54	0,45	0,43	0,42
8	-	-	-	-	-	-	-	0,57	0,41	0,44	0,39	0,45	0,48
9	-	-	-	-	-	-	-	-	0,50	0,38	0,29	0,45	0,41
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,43	0,56	0,45	0,43
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,57	0,48	0,48
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,53	0,32
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,38

*1: Mole de Volta Grande; 2: Australiano; 3: HV-204; 4: HV-241; 5: HV-268; 6: HV-281; 7: HV-290; 8: HV-400; 9: HV-296; 10: Cameroon; 11: Gramafante; 12: Venezuela; 13: Elefante Roxo; e 14: Elefante B. Fonte: Freitas et al. (2000).

O grau de similaridade entre os genótipos com base no Índice de Jaccard é apresentado na Tabela 3. Considerando as 91 combinações entre os 14 materiais, foi observado para uma maioria de 63 comparações, alto grau de similaridade genética, que variou de 0,41 até 0,65. Os autores concluíram que existe variabilidade genética nos padrões eletroforéticos em todos os genótipos avaliados, sendo possível a identificação da coleção de forma rápida e segura utilizando apenas os padrões de esterase.

Resultados divergentes foram encontrados por Bhandari et al. (2006), ao avaliarem a diversidade genética entre 64 acessos de capim elefante provenientes de várias regiões geográficas da Índia, a partir de padrões enzimáticos [sistemas malato desidrogenase (MDH), GOT e POX]. Para MDH foi encontrado um total de seis bandas, 16 para GOT e 14 para POX. Os autores destacaram a eficiência dos três sistemas enzimáticos, identificando mais de 90% dos acessos.

Estes trabalhos exaltaram a inconsistência dos resultados quanto à reprodutibilidade da metodologia. Por este motivo principalmente, o uso de marcadores bioquímicos para avaliação da divergência genética vem sendo pouco explorado.

Marcadores de DNA

Polimorfismos em nível de DNA podem ser detectados por vários métodos. As diferenças entre

indivíduos são notadas quando se visualiza diferentes tamanhos de fragmentos de DNA entre estes. A forma como esses fragmentos são obtidos varia com o tipo de metodologia empregada (MOREIRA, 2010).

Os principais tipos de marcadores de DNA podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização e amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*); Microssatélite; e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (MILACH, 1998). Mais recentemente, a análise de etiquetas de seqüências expressas (*Expressed Sequence Tags* - ESTs) tem fornecido informações rápidas e precisas a respeito da estrutura e função dos genes.

Atributos como consistência e tempo para obtenção de resultados, nível de polimorfismo obtido, custo e facilidade de uso são importantes para a implementação de marcadores de DNA na rotina de um programa de melhoramento. A comparação dos tipos de marcadores para essas características encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação entre marcadores moleculares para cinco atributos de importância para o melhoramento de plantas.

Tipo de marcador	Consistência	Tempo para resultados	Custo	Facilidade de implementar	Polimorfismo ¹
RFLP	Maior	Maior	Maior	Menor	Baixo-médio
VNTR					Alto
AFLP					Alto
Microssatélite					Alto
RAPD	Menor	Menor	Menor	Maior	Médio-alto

¹Varia com a espécie. Fonte: Milach (1998).

Ferreira e Grattapaglia (1996) destacaram como sendo características desejáveis nos marcadores de DNA o alto polimorfismo, a reprodutibilidade, co-dominância, discriminância, baixo custo e facilidade na mensuração.

Daher et al. (2002) avaliaram a divergência genética entre nove genótipos do grupo Napier a partir de marcadores RAPD em Campos dos Goytacazes/RJ. Foram analisados 37 *primers*, sendo obtido um total de 167 bandas, dos quais 94 foram polimórficos e 73 monomórficos. A análise de agrupamento pelo método de Tocher, baseada no índice de similaridade de Nei & Li, promoveu a formação de três grupos distintos (Tabela 5), indicando haver variabilidade genética entre os acessos.

Lowe et al. (2003) avaliaram 56 acessos de capim elefante e híbridos interespecíficos usando 67 marcadores RAPD em Nairobi, Quênia. Estes autores estimaram a distância genética média em 0,31 a qual consideraram um indicativo de ampla variabilidade genética entre os acessos.

Passos et al. (2005) avaliaram a divergência genética entre dez genótipos de capim elefante a partir de 44 marcadores RAPD's em Juiz de Fora/MG. Os autores observaram um total de 160 bandas de DNA, das quais 77% foram polimórficas e 23% monomórficas. A análise de agrupamento (baseada na distância de Nei & Li) identificou a formação de quatro grupos (Figura 8). Os genótipos mais similares foram Cameroon e Vruckwona, com distância genética média de 0,06. Os autores concluíram que

existe baixa variabilidade genética entre os genóti-

pos, mesmo sendo bastante contrastantes em sua morfologia e fisiologia.

Tabela 5. Análise de dissimilaridade genética entre nove genótipos de capim elefante a partir do método de Tocher.

Grupo	Genótipos
1	Napier de Volta Grande; Napier nº 2; Mercker; Mineiro; Napier; Napierzinho; e Pusa Napier nº 2
2	Pusa Gigante Napier
3	Pusa Napier nº 1

Fonte: Daher et al. (2002).

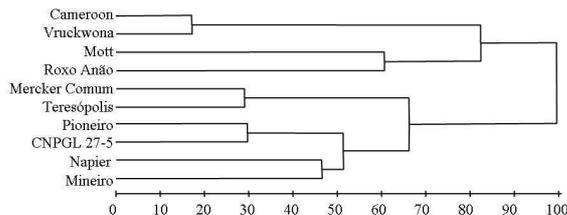


Figura 8. Dendrograma mostrando dez acessos de capim elefante baseado na distância genética de Nei & Li usando o método UPGMA e marcadores RAPD. Fonte: Passos et al. (2005).

Pereira et al. (2008) avaliaram a diversidade genética entre trinta genótipos de capim elefante por meio de 20 marcadores RAPD previamente selecionados. Foram identificadas 88 bandas, das quais 64 foram polimórficas e 24 monomórficas. A maior distância genética, a partir da matriz das distâncias de Nei & Li, foi entre a cultivar Mercker Comum (genótipo capim elefante) e a Pinda Napier x 23A (híbrido interespecífico triplóide), com 0,34, o que reflete as diferenças morfológicas e genéticas entre os genótipos. As cultivares Porto Rico, Santa Rita e IJ-7136 cv. EMPASC 307; Mineiro e Mineiro Ipeaco apresentaram distâncias genéticas nulas, indicando tratar-se do mesmo material genético com denominações diferentes. Outros genótipos apresentaram distâncias mínimas entre si, indicando o alto grau de parentesco. Desta forma, os autores destacaram a eficiência da técnica de RAPD na detecção de variabilidade genética e de duplicatas entre os genótipos de capim elefante, incluindo a seleção de genitores divergentes para programas de hibridação.

Apesar da existência de marcadores de DNA de maior consistência (Tabela 4), têm-se empregado os marcadores RAPD. Contudo, esta técnica produz um número relativamente pequeno de fragmentos, tornando-se problemática quando há um grande número de amostras. Além disso, a técnica RAPD pode produzir ampliações dos fragmentos inconsistentes, que pode mascarar os objetivos, podendo ser necessária a repetição das análises (STRUWIG et al., 2009). Lowe et al. (2003) destacaram as limitações desta técnica, indicando seu uso nas fases iniciais de avaliação da variabilidade genética intra-específica do germoplasma.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na determinação da variabilidade genética em capim elefante, os caracteres diâmetro do colmo, altura da planta e comprimento da folha são importantes variáveis, indispensáveis na identificação de genótipos divergentes de uma coleção.

Considerando os trabalhos pesquisados, as metodologias aplicadas foram eficientes em determinar a variabilidade genética, sendo esta de alta magnitude na maioria dos genótipos de capim elefante estudados no Brasil e em outros países, nos níveis biométrico e molecular, podendo esta ser explorada por programas de melhoramento através de métodos de seleção ou de hibridações intra e interespecíficas. Contudo, a escolha da metodologia mais adequada vai depender do custo das análises, de sua reprodutibilidade, do nível de precisão e de acurácia desejada, tempo de processamento dos dados e, principalmente, do objetivo para o qual os resultados serão utilizados.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. C. et al. Mixoploidia em híbridos de capim elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, 2006.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgar Blucher, 1971. 381 p.
- BHANDARI, A. P.; SUKANYA, D. H.; RAMESH, C. R. Application of isozyme data in fingerprinting napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) for germplasm management. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, n. 1, p. 253-264, 2006.
- CARNEIRO, M. S. S. et al. Efeito do consórcio de capim elefante com leucena na produção de forragem. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 1, p. 51-55, 2006.
- CRUZ, C. D. **Princípios de genética quantitativa**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 394 p.

- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 390 p.
- DAHER, R. F. et al. Genetic divergence among elephant grass cultivars assessed by RAPD markers in composit samples. **Scientia Agricola**, São Paulo, v. 59, n. 4, p. 623-627, 2002.
- DAHER, R. F.; VÁZQUEZ, H. M.; PEREIRA, A. V. Introdução e avaliação de clones de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) em Campos dos Goytacazes, RJ. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, n. 5, p. 1296-1301, 2000.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa/CENARGEN, 1996. 220 p.
- FERREIRA, P. V. **Melhoramento de plantas**. Maceió: UFAL, 2006. 856 p.
- FERREIRA, R. P.; PEREIRA, A. V. Melhoramento de forrageiras. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 781-812.
- FREITAS, N. S. A. et al. Caracterização e diversidade genética do capim elefante e seus híbridos com milho mediante padrões isoenzimáticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 6, 1125-1133, 2000.
- JAUHAR, P. P.; HANNA, W. W. Cytogenetics and genetics of pearl millet. **Advances in Agronomy**, v. 64, p. 1-26, 1998.
- LOWE, A. J. et al. Characterisation of germplasm accessions of Napier grass (*pennisetum purpureum* and *P. purpureum* × *P. glaucum* Hybrids) and comparison with farm clones using RAPD. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, n. 2, p. 121-132, 2003.
- GUERRA, L. J. C. **Las gramíneas (Poaceae) de Cuba, II**. Madrid: Real Jardín Botánico, 2002. 167 p.
- MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA: Aplicações no melhoramento de plantas. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 1, p. 14-17, 1998.
- MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141 p.
- MOURA, W. M. et al. Divergência genética em linhagens de pimentão em relação a eficiência nutricional de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 217-224, 1999.
- MOREIRA, R. F. C. **Marcadores bioquímicos e de DNA: importantes ferramentas no melhoramento genético em frutíferas**. Disponível em: <www.todafruta.com.br>. Acesso em: 22 abri. 2010.
- PAIVA, E. A. A. **Meiose em híbridos hexaplóides de capim elefante e milho**. 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- PASSOS, L. P. et al. Molecular characterization of elephant grass accessions through RAPD markers. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 568-574, 2005.
- PEREIRA, A. V. Escolha de variedades de capim elefante. In: Simpósio sobre manejo de pastagem, 10., 1992, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1992. p. 45-62.
- PEREIRA, A. V. et al. Variação da qualidade de folhas em cultivares de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e híbridos de capim elefante x milho (*P. purpureum* x *P. glaucum*), em função da idade da planta. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 490-499, 2000.
- PEREIRA, A. V. et al. Diversidade genética entre acessos de capim elefante obtida com marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, n. 7, p. 1216-1221, 2008.
- SHIMOYA, A. et al. Divergência genética entre acessos de um banco de germoplasma de capim elefante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 971-980, 2002.
- SPRAY, C. R. et al. The dwarf-1 (dl) mutant of *Zea mays* blocks three steps in the gibberellins biosynthetic pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 19, p. 10515-10518, 1996.
- STRUWIG, M. et al. AFLPs are incompatible with RAPD and morphological data in *Pennisetum purpureum* (Napier grass). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 645-652, 2009.
- TCACENCO, F. A.; LANCE, G. N. Selection of morphological traits for characterization of elephant grass accessions. **Tropical Grassland**, v. 26, n. 3, p. 145-155, 1992.
- TROPICAL FORAGE. *Pennisetum purpureum*. Disponível em: <www.tropicalforages.info >. Acesso em: 22 abri. 2010.
- WOUW, M. V.; HANSON, J.; LUETHI, S. Morpho-

logical and agronomic characterization of a collection of napier grass (*Pennisetum purpureum*) and *P. purpureum* x *P. glaucum*. **Tropical Grassland**, v. 33, n. 2, p. 150-158, 1999.

WOUW, M. V.; HANSON, J.; NOKOE, S. Observation strategies for morphological characterization of forages. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 46, n. 2, p. 63-71, 1999.