

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE *Bromus auleticus* TRINIUS

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS IN *Bromus auleticus* TRINIUS

Lia Rejane Machado Silveira¹ João Carlos Pinto Oliveira² Carlos Otávio Costa Moraes²
Daniela Giffoni Marques³

RESUMO

Bromus auleticus Trinius é uma gramínea forrageira nativa, de ampla disseminação na América do Sul Temperada, porém de baixa frequência de ocorrência nos campos naturais. Apresenta significativo crescimento vegetativo no outono-inverno, período crítico para a alimentação dos rebanhos em função da baixa produção do campo nativo, característica que a torna potencialmente apta a ser introduzida nos estabelecimentos agropecuários. No Banco de Germoplasma do Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros - CPPSUL da EMBRAPA, localizado em Bagé, RS, há 46 acessos de *B. auleticus* provenientes de coletas realizadas no Uruguai. O presente trabalho teve por objetivo analisar a diversidade genética existente entre os acessos de *B. auleticus* mais produtivos da coleção. Os resultados da análise serão de utilidade no planejamento e implementação do programa de melhoramento genético desta forrageira. Plantas de cerca de 10 meses de idade, obtidas por polinização livre de uma planta de cada um dos 15 acessos, tiveram determinadas a largura da folha e a pilosidade das faces adaxial e abaxial da folha. O procedimento adotado para o estudo da diversidade genética foi a estimação dos índices de diversidade fenotípica (H'), de Shannon e Weaver (1962), para os dois caracteres morfológicos mencionados e a comparação dos acessos através do teste de *t*. Verificou-se maior variabilidade fenotípica para largura de folha, cuja característica é condicionada por poligenes. A pilosidade da folha demonstrou ser o melhor marcador genético, permitindo a

discriminação genética de quatro pares de acessos. Os caracteres empregados, entretanto, não se mostraram adequados para revelar a reserva de variabilidade genética armazenada e ainda não explorada para fins de melhoramento genético.

Palavras-chave: variabilidade, gramínea forrageira, marcadores morfológicos.

SUMMARY

Bromus auleticus is a native forage grass extensively disseminated along the Temperate South American Continent occurring, however, with low frequency in the natural grassland. It shows a significant vegetative growth during Autumn-Winter months which are critical for cattle due to the low productivity of the native pastures, what turns it to be a potentially interesting forage grass to be introduced in the field. Forty six entries of *B. auleticus* from Uruguay are available at the Germoplasm Bank of the Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros - CPPSUL - EMBRAPA, in Bagé, RS. The aim of this work was to analyse the genetic diversity among more productive *B. auleticus* entries. The results of this analysis is useful for planning and establishment of a plant breeding program for this specie. Width and pilosity of both leaf faces were measured and open polinated plants obtained from one individual of each entry. The genetic diversity was analysed by phenotypic diversity index (H') for both

¹Engenheiro Agrônomo, Mestre, Professor do Departamento de Fitotecnia/UFSM, Campus Universitário, 97119-900 Santa Maria, RS. Endereço eletrônico: slia@ccr.ufsm.br. Autor para correspondência.

²Engenheiro Agrônomo, Mestre, Pesquisador da EMBRAPA/Centro de Pesquisa em Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros - CPPSUL - EMBRAPA/CPPSUL.

³Engenheiro Agrônomo, Bolsista de Aperfeiçoamento/FAPERGS, Departamento de Fitotecnia/UFSM.

morphological characteristics mentioned and the entries were compared using the Student t test. Higher phenotypic variability was observed for leaf width as expected from polygenic traits but the leaf pilosity showed to be the best genetic marker permitting to distinguish four access pairs. The traits used, however, were not considered appropriate to reveal the genetic diversity reserve and not yet explored for genetic improvement.

Key words: *variability, forage grass, morphological markers.*

INTRODUÇÃO

O outono e o inverno, no Rio Grande do Sul, são caracterizados como períodos de carência alimentar dos rebanhos bovino e ovino em decorrência da baixa produção, nessas estações, das forrageiras componentes dos campos nativos. Em consequência, as instituições de pesquisa do Estado vêm priorizando a busca de alternativas que atenuem a escassez de forragem durante a estação fria (JACQUES, 1986), um dos principais limitantes da produção animal (RODRIGUES, 1986). Nesse sentido, grande atenção tem sido dispensada à identificação de espécies e/ou cultivares de gramíneas e leguminosas forrageiras perenes com boa produção no período crítico.

Bromus auleticus Trinius é uma gramínea forrageira nativa, de ampla disseminação na América do Sul temperada (BURKART, 1969), porém de baixa frequência de ocorrência nos campos naturais (OLMOS, 1993). Atende à necessidade de crescimento hibernal apresentando, também, ausência de latência estival (MORAES & OLIVEIRA, 1990) e ótimo valor forrageiro (GIRARDI-DEIRO & GONÇALVES, 1987). Além disso, mostra-se resistente à seca e ao fogo, persistindo na pastagem por cinco a seis anos, pelo menos, ressemeando naturalmente (OLMOS, 1993). Essas características tornam a espécie potencialmente capaz de auxiliar na suplementação alimentar do rebanho no período crítico.

A esse respeito, OLMOS (1993) considera que, dentre as forrageiras nativas que apresentam crescimento outono-hibernal importante, como *Bromus auleticus*, *Hordeum stenostachys*, *Poa lanigera* e *Stipa setigera*, *B. auleticus* é a de mais fácil domesticação e apta a ser introduzida nos estabelecimentos agropecuários.

Bromus auleticus é conhecida pelos nomes comuns de cevadilha vacariana ou cevadilha-crioula e faz parte da sub-família Festuceae, tribo Poeae (LONGHI, 1975). A secção Bromopsis do gênero *Bromus* reúne espécies perenes com números de cromossomos somáticos que variam de diplóide ($2n=2X=14$) a octaplóide ($2n=8X=56$), incluindo *B. auleticus* com $2n=6X=42$ cromossomos (STEBBINS, 1956).

No Banco de Germoplasma do Centro de Pesquisa em Pecuária dos Campos Sulbrasilianos-CPPSUL/EMBRAPA, localizado em Bagé, RS, há 54 acessos de *Bromus auleticus* provenientes de uma antiga coleção do Prof. Rosengurt, da Faculdade de Agronomia de Montevideo, Uruguai. Estes acessos estão sendo caracterizados botânica e agronomicamente desde 1990 pela equipe responsável pelo Banco de Germoplasma e colaboradores.

A caracterização agrônômica foi efetuada a partir de plantas individuais, para os seguintes caracteres: produção de matéria verde, capacidade de rebrote, persistência, proteína bruta, digestibilidade *in vitro* da matéria seca e produção de sementes (MORAES & OLIVEIRA, 1990). Todos os acessos revelaram boa qualidade de forragem, em termos de proteína bruta e digestibilidade *in vitro* da matéria seca, além de evidenciar a presença de grande variabilidade fenotípica para os caracteres analisados.

A avaliação do potencial forrageiro da espécie, incluindo a fase de experimentação com animais, bem como aspectos relacionados à qualidade fisiológica das sementes de *B. auleticus* também vêm sendo efetuados. A fase seguinte do trabalho será destinada à definição do programa de melhoramento genético dessa forrageira.

A detecção, a quantificação e a qualificação, ou seja, a caracterização da diversidade genética é instrumento de grande importância para o melhoramento genético de uma espécie, cujo objetivo é fixar variantes genéticas úteis dentro de cultivares, através de cruzamentos seletivos (TORGGLER *et al.*, 1995).

A análise da diversidade genética em plantas pode ser pensada em dois níveis complementares. Em uma conceituação inicial, a diversidade se refere ao número de espécies vegetais em um dado ecossistema ou região. Em uma conceituação mais ampla, a diversidade inclui a variação genética existente em cada espécie, nas diferentes populações que a constituem. Neste caso, é mais comumente referida como variabilidade genética ou polimorfismo (KAGEYAMA, 1987). A quantidade de polimorfismo é uma medida útil da variação genética, cujo critério mais usado é aquele em que o loco somente é considerado polimórfico quando o alelo mais comum não apresenta frequência superior a 0,95 ou 95% (LEWONTIN, 1972).

Os estudos sobre a diversidade genética na coleção de germoplasma podem ser realizados a partir dos caracteres morfológicos de natureza qualitativa ou quantitativa ou com os dados derivados da análise dos sistemas isoenzimáticos (MOREIRA *et al.*, 1994).

No presente trabalho, a largura da folha e a pilosidade das faces adaxial e abaxial da folha foram utilizadas como caracteres morfológicos em um estudo cujo objetivo foi analisar a diversidade genética existente entre os acessos mais produtivos da Coleção de *B. auleticus* do Banco de Germoplasma da EMBRAPA/CPPSUL.

MATERIAIS E MÉTODOS

Em agosto de 1991, em área pertencente à EMBRAPA/CPPSUL foram instaladas, em linhas distantes entre si 1,0m, progênies dos 15 acessos de *B. auleticus* mais produtivos conforme determinado por MORAES & OLIVEIRA (1990).

Cada progênie foi constituída de 50 mudas, plantadas em espaçamento de 0,3m na linha, obtidas de sementes germinadas em condições de casa de vegetação nos meses de abril a maio de 1991. As sementes de cada acesso, por sua vez, foram provenientes de polinização livre, ocorrida na primavera-verão de 1990-91, de uma planta individual pertencente à Coleção de *B. auleticus* da EMBRAPA/CPPSUL.

Em fevereiro de 1992, as plantas sobreviventes, então com cerca de 10 meses de idade, tiveram determinados, sob microscópio estereoscópico: a largura da folha mais comprida, tomada em sua parte central, e a presença/ausência de pilosidade nas faces adaxial e abaxial desse mesmo segmento de folha.

De cada progênie resultaram quatro classes fenotípicas em relação à pilosidade: a) presença de pelos nas duas faces da folha, adaxial e abaxial, simbolizado por PP; b) presença de pelos apenas na face adaxial da folha, símbolo PA; c) presença de pelos somente na face abaxial da folha, símbolo AP; e, d) ausência de pelos em ambas as faces da folha, representado pelo símbolo AA.

As medidas de largura de folha foram agrupadas em intervalos, resultando três classes fenotípicas: a) folha estreita (1,5-3,5mm); b) folha intermediária (3,6-5,5mm); e, c) folha larga (5,6-8,0mm).

O procedimento adotado para o estudo da diversidade genética nos acessos de *B. auleticus* foi a estimação dos índices de diversidade fenotípica (H') de Shannon e Weaver (1962), de acordo com metodologia descrita por MOREIRA *et al.* (1994). No emprego desse índice, os dois caracteres, medidos nos 15 acessos que fazem parte da Coleção, foram subdivididos nas diferentes classes fenotípicas mencionadas, com as proporções obtidas sendo usadas para calcular os índices de diversidade fenotípica.

Usou-se, para isso, a expressão:

$$H' = -3,3219 \left[\sum_{i=1}^n P_i \log_{10} P_i \right]$$

onde n = número de classes em que se divide o caráter; e

P_i = proporção fenotípica de i -ésima classe para o caráter avaliado

O índice H' , no caso de se trabalhar com amostras grandes, tem distribuição que se aproxima da normal, com variância equivalente a:

$$VH' = 11,035 \left[\sum_{i=1}^n \log_{10}^2 P_i - \left(\sum_{i=1}^n P_i \log_{10} P_i \right)^2 \right] / N + (n-1)/2N^2$$

onde n e P_i têm os mesmos significados referidos anteriormente e N é o tamanho da amostra.

Os valores de H' dos diferentes acessos foram comparados usando-se o teste de t , em que:

$$t = \frac{H'_1 - H'_2}{\sqrt{(VH'_1 + VH'_2)^{1/2}}}$$

onde H'_1 e H'_2 são os valores do índice para os dois caracteres; e VH'_1 e VH'_2 , as variâncias para os primeiro e segundo caracteres.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proporções das diferentes classes fenotípicas relativas aos dois caracteres morfológicos utilizados no estudo da diversidade genética dos acessos de *B. auleticus* encontram-se na Tabela 1.

Em 14 dos acessos analisados verifica-se a existência de polimorfismo para a característica pilosidade da folha. A entrada 582, que apresenta apenas dois fenótipos: AP e PP, o último com frequência de 0,97, constitui a única exceção, sendo considerada monomórfica para o caráter. Os acessos 841 e 868 também manifestam os mesmos fenótipos do 582, porém com percentuais ligeiramente inferiores a 95% para a classe fenotípica folha pilosa em ambas as faces. De maneira semelhante, o acesso 698 também apresenta predominância do fenótipo PP (94,74%), contudo, diferente dos anteriores, revela, além deste, outros dois fenótipos (Tabela 1).

Tabela 1 - Procedência, tamanho da amostra e distribuição de frequência das diferentes classes fenotípicas para os dois caracteres estudados nos 15 acessos de *Bromus auleticus* Trinius.

| Acesso (Código BRA) | Procedência ¹ | Tamanho Amostra | Pilosidade ² | | | | Largura Folha ³ | | |
|------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------|--------|--------|--------|----------------------------|--------|--------|
| | | | AA | AP | PA | PP | E | I | L |
| 311 | Desconhecida | 41 | 0,878 | 0,0488 | 0,0488 | 0,0244 | 0,122 | 0,5609 | 0,3171 |
| 639 | Desconhecida | 34 | 0,0588 | 0,2059 | 0,0 | 0,7353 | 0,2647 | 0,6471 | 0,0881 |
| 680 | Desconhecida | 34 | 0,2353 | 0,4118 | 0,0 | 0,3529 | 0,2353 | 0,7353 | 0,0294 |
| 957 | Desconhecida | 41 | 0,122 | 0,0975 | 0,0244 | 0,7561 | 0,2683 | 0,6098 | 0,1219 |
| 507 | Paysandu | 39 | 0,0 | 0,3778 | 0,0 | 0,6222 | 0,2222 | 0,6889 | 0,0889 |
| 582 | Paysandu | 36 | 0,0 | 0,0278 | 0,0 | 0,9722 | 0,3333 | 0,6111 | 0,0556 |
| 698 | Paysandu | 38 | 0,0 | 0,0263 | 0,0263 | 0,9474 | 0,5526 | 0,4474 | 0,0 |
| 817 | Paysandu | 39 | 0,0256 | 0,4782 | 0,0 | 0,4872 | 0,2564 | 0,6667 | 0,0769 |
| 931 | Paysandu | 38 | 0,0526 | 0,1053 | 0,0263 | 0,8158 | 0,1053 | 0,7105 | 0,1842 |
| 558 | Florida | 39 | 0,4103 | 0,3846 | 0,0 | 0,2051 | 0,3077 | 0,6667 | 0,0256 |
| 655 | Florida | 41 | 0,0488 | 0,2927 | 0,0 | 0,6585 | 0,2195 | 0,7073 | 0,0732 |
| 744 | San Jose | 39 | 0,0769 | 0,5383 | 0,0 | 0,3846 | 0,0769 | 0,8462 | 0,0769 |
| 761 | Tacuarembó | 39 | 0,0769 | 0,1282 | 0,0256 | 0,7693 | 0,3846 | 0,5385 | 0,0769 |
| 841 | Montevideo | 35 | 0,0 | 0,0571 | 0,0 | 0,9429 | 0,20 | 0,6857 | 0,1143 |
| 868 | Rio Negro | 36 | 0,0 | 0,0556 | 0,0 | 0,9444 | 0,1667 | 0,7778 | 0,0555 |

¹ Local de coleta dos acessos (Departamento) na República Oriental do Uruguai

² Distribuição de frequência nas quatro classes fenotípicas de pilosidade: PP= presença de pelos nas duas faces da folha, adaxial e abaxial; PA= presença de pelos apenas na face adaxial da folha, AP= presença de pelos apenas na face abaxial da folha; e AA= ausência de pelos em ambas as faces da folha

³ Distribuição de frequência nas três classes fenotípicas de largura de folha: E= folha estreita (1,5-3,5mm); I= folha intermediária (3,6-5,5mm); L= folha larga (5,6-8,0mm)

Já o caráter largura de folha, não apresenta monomorfismo em nenhum acesso (Tabela 1). Os três fenótipos ocorrem em todos as entradas, com exceção da de código 698, em que as folhas das plantas amostradas são divididas em estreitas e intermediárias apenas.

Na Tabela 2 encontram-se os índices de diversidade fenotípica calculados para cada uma das características. Em relação à pilosidade de folha, pode-se observar uma amplitude de variação de 0,0006 - 0,4654, encontradas nos acessos 841 e 507 respectivamente. Para largura de folha, a faixa de variação é semelhante, de 0,0299 - 0,4935, encontradas nos acessos 311 e 698 respectivamente. O índice de diversidade fenotípica médio, considerando-se ambas as características, apresenta o limite inferior de 0,06 na entrada 311 e o superior, de 0,36, no acesso de código 507 (Tabela 2).

Os valores de H' para as duas características de *B. auleticus* estudadas de maneira individual ou agrupada revelam-se baixos. JAIN *et al.* (1975) encontraram os limites de 0,4 - 0,8 para H' ao analisar seis caracteres em mais de três mil acessos de trigo mantidos na coleção do Departamento de Agricultura (USDA) dos Estados Unidos. Em cevada, TOLBERT

et al. (1979) observaram limites mais reduzidos de H' , variando de 0,04 - 0,6, para caracteres agrupados.

Manifestam diversidade genética, ao nível de 5% de probabilidade, para o caráter pilosidade de folha, os pares 507-698, 507-868; já os pares 507-582 e 507-841 apresentam diversidade fenotípica significativa em nível de 1% de probabilidade. Para o caráter largura de folha, apenas o par 311-698 revela diferença significativa ($P < 0,01$) em relação à diversidade genética estimada por H' ; os demais acessos não diferem significativamente.

Pode-se verificar que o caráter largura de folha, em relação ao qual todos os acessos são polimórficos, separa menos acessos que a outra característica empregada, a pilosidade de folha, em que há menos polimorfismo. Aliás, evidenciam diversidade genética significativa justamente aqueles pares em que um dos acessos apresenta a frequência do alelo mais comum próxima do valor de 0,95 ou é monomórfico.

Contudo, há que se considerar que fatores como o ambiente, a herança multigênica e quantitativa, a dominância parcial e incompleta, confundem a expressão de uma característica genética (TANKSLEY *et al.*, 1989). Em função disto, as características condicionadas por um ou poucos pares de genes, como

Tabela 2- Estimativa dos índices de diversidade fenotípica (H') e da variância (VH'), média da diversidade e erro padrão (H'± SE) para os dois caracteres estudados em 15 acessos (dados normalizados).

| Acesso (Código BRA) | Pilosidade de folha | | Largura de Folha | | H'± SE |
|------------------------|---------------------|--------|------------------|--------|-------------|
| | H' | VH' | H' | VH' | |
| 311 | 0,0843 | 0,0512 | 0,0299 | 0,0134 | 0,06 ± 0,04 |
| 639 | 0,2213 | 0,034 | 0,2679 | 0,0249 | 0,24 ± 0,03 |
| 680 | 0,3285 | 0,0038 | 0,2725 | 0,0302 | 0,30 ± 0,04 |
| 957 | 0,1410 | 0,044 | 0,2821 | 0,0549 | 0,21 ± 0,10 |
| 507 | 0,4654 | 0,0029 | 0,2460 | 0,0222 | 0,36 ± 0,16 |
| 582 | 0,0425 | 0,0201 | 0,2865 | 0,0792 | 0,16 ± 0,17 |
| 698 | 0,0487 | 0,0358 | 0,4935 | 0,0009 | 0,27 ± 0,31 |
| 817 | 0,3171 | 0,0122 | 0,2593 | 0,0232 | 0,29 ± 0,04 |
| 931 | 0,1234 | 0,0527 | 0,2319 | 0,029 | 0,18 ± 0,08 |
| 558 | 0,3258 | 0,0044 | 0,2678 | 0,0194 | 0,30 ± 0,04 |
| 655 | 0,2673 | 0,0408 | 0,2369 | 0,0259 | 0,25 ± 0,02 |
| 744 | 0,3058 | 0,0143 | 0,1365 | 0,405 | 0,22 ± 0,12 |
| 761 | 0,1490 | 0,0448 | 0,3058 | 0,0144 | 0,23 ± 0,11 |
| 841 | 0,0006 | 0,0256 | 0,2459 | 0,0285 | 0,12 ± 0,17 |
| 868 | 0,0864 | 0,0248 | 0,1918 | 0,0366 | 0,14 ± 0,07 |

acredita-se ser o caso da presença/ausência de pelos na folha, menos influenciadas pelo ambiente, são consideradas mais aptas a atuarem como marcadores genéticos.

CONCLUSÕES

Os índices de diversidade fenotípica estimados apresentam valores reduzidos, indicando que as características morfológicas empregadas não são capazes de evidenciar a diversidade genética existente nos acessos de *Bromus auleticus*; é possível a separação de apenas cinco pares de acessos através da estimação dos índices de diversidade fenotípica; e, a pilosidade de folha demonstra ser melhor marcador genético que a largura de folha.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Profª. Lenira M. N. Sepel e ao Prof. Lindolfo Storck, ambos da UFSM, pelas relevantes contribuições fornecidas para a elaboração do presente artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURKART, A. Flora ilustrada de Entre-Rios (Argentina). Colección Científica del INTA, Entre-Rios, v. 6, n. 2, 1969.

GIRARDI-DEIRO, A.M., GONÇALVES, J.O.N. Flora campestre de Bagé, RS. In: EMBRAPA, CNPO. **Coletânea de Pesquisas: Forrageiras**. Bagé, 1987. p. 17-32

JACQUES, A.V.A. Forrageiras para a região sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PASTAGENS, Piracicaba, 1986. **Anais...** Piracicaba, FEALQ, 1986. p. 443-453.

JAIN, S.K., QUALSET, C.O., BHATT, G.M., *et al.*, Geographical patterns of phenotypic diversity in a world collection of durum wheats. **Crop Science**, Madison, v. 15, p. 700-704, 1975.

KAGEYAMA, P.Y. Conservação *in situ* de recursos genéticos de plantas. **Rev do IPEF**, São Paulo, v. 35, p. 7-37, 1987.

LEWONTIN, R.C. The apportionment of human diversity. **Evol Biol**, New York, v. 6, p. 381-392, 1972.

LONGHI, H.M. O gênero *Bromus* L. (Gramineae) no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 26, Rio de Janeiro, 1975. **Anais...** Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 1977. p. 333-342.

MORAES, C.O.C., OLIVEIRA, J.C.P. **Avaliação agrônômica preliminar de genótipos de *Bromus auleticus* Trinius**. Bagé, EMBRAPA-CNPO, 1990. (Circular Técnica, 6). 20 p.

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

OLMOS, F. *Bromus auleticus*. Tacuarembó, Uruguai, INIA, 1993. (Serie Técnica, 35). 30 p.

RODRIGUES, L.R.A. Espécies forrageiras para pastagens: gramíneas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PASTAGENS, Piracicaba, 1986. **Anais...** Piracicaba, FEALQ, 1986. P. 375-387.

STEBBINS, G.L. Cytogenetics and evolution of grass family. **Amer J Bot**, Baltimore, v. 42, n. 10, p. 890-905, 1956.

TANKSLEY, S.D., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H., *et al.*, RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biotechnology**, London, n. 7, p. 257-264. 1989.

TOLBERT, D.M., QUALSET, C.O., JAIN, S.K., *et al.* A diversity analysis of a world collection of barley. **Crop Science**, Madison, v. 19, p. 789-794, 1979.

TORGGLER, M.G.F., CONTEL, E.P.B., TORGGLER, S.P. Isoenzimas - Variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186 p.