

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/ GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Flávia Rangel de Souza

**TAXA DE CRUZAMENTO EM CAPIM-ELEFANTE (*Cenchrus
purpureus*) POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação de Mestrado

Juiz de Fora

2017

FLÁVIA RANGEL DE SOUZA

**TAXA DE CRUZAMENTO EM CAPIM-ELEFANTE (*Cenchrus
purpureus*) POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Marco Antônio Machado

Co-orientadora: Ana Luisa Sousa Azevedo

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Flávia Rangel de.

Taxa de cruzamento de capim-elefante (*Cenchrus purpureus*) por meio de marcadores moleculares / Flávia Rangel de Souza. -- 2017. 59 f.

Orientador: Marco Antônio Machado

Coorientadora: Ana Luisa Souza Azevedo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. *Cenchrus purpureus*. 2. taxa de cruzamento. 3. microssatélite. 4. alogamia. I. Machado, Marco Antônio, orient. II. Azevedo, Ana Luisa Souza, coorient. III. Título.

FLÁVIA RANGEL DE SOUZA

**TAXA DE CRUZAMENTO EM CAPIM-ELEFANTE (*Cenchrus purpureum*)
POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 21 / 02 / 2017.

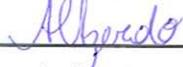
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marco Antônio Machado

Orientador

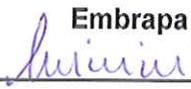
Embrapa



Prof.ª Dr.ª Ana Luísa Sousa Azevedo

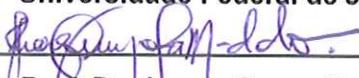
Coorientadora

Embrapa



Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Juarez Campolina Machado

Embrapa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser meu conselheiro, meu amigo, e por me acompanhar durante esse período do mestrado. Sei que Ele é o responsável por todas as bênçãos na minha vida.

Agradeço à instituição UFJF, por ser a universidade que me graduou e que me permitiu continuar meus estudos. À Fapemig, pelo financiamento da bolsa de estudos, Capes, Embrapa e CNPq, pelo financiamento do projeto realizado, em especial a Embrapa, por me disponibilizar a infra-estrutura para os estudos.

Agradeço ao meu orientador, professor doutor Marco Antônio Machado, por me aceitar orientar e disponibilizar o laboratório para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Agradeço, em especial, à doutora Ana Luisa Sousa Azevedo, co-orientadora da dissertação, que teve a paciência em ensinar, em ouvir as minhas dúvidas, em aconselhar nos problemas que apareciam. Acredito que aprendi muito durante este período, com uma visão da genética que não tinha contato.

Agradeço aos colegas, e agora amigos, do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, em especial aos que me ensinaram e me ajudaram em meus estudos, Dani, Fernando e Tati. E além desses, a todos que compartilharam momentos de risadas, conversas, conselhos, festas de aniversários e de despedidas, Raquel, Juliana, Hyago, Felipe, Thiago, Mayara e Selda.

Agradeço aos amigos cultivados da graduação, Ana Luiza, Victória, Paola, Ludemila, Ludymila e Robson, pelos bons momentos vividos em Juiz de Fora, pela amizade de sempre e pelos conselhos de vida. Em especial, agradeço à Ana Luiza e Victória, duas amigas que me acompanham na pós graduação, que sempre me iluminam nos momentos de dúvida, e sempre me apoiam nas decisões tomadas.

Finalmente, agradeço à minha família, pelo apoio, pelo amor dedicado, pelo carinho. Agradeço em especial à minha mãe, Fátima, à minha tia, Lurdinha, ao meu pai Ivan e ao meu tio, Ivan, por me apoiar na realização do sonho de ser uma futura pesquisadora; à minha prima, que considero como irmã, Miriã, e marido, agora primo, Conrado, por acompanhar de perto o meu sonho em Juiz de Fora, e por estar sempre ao meu lado quando preciso.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”

Mahatma Gandhi

RESUMO

O capim-elefante (*Cenchrus purpureus*) é uma gramínea perene utilizada na alimentação bovina, principalmente na bovinocultura de leite. Atualmente, devido a sua alta produção de biomassa, o capim-elefante tem sido utilizado como insumo energético na produção de energia térmica (combustão direta, carvão vegetal e resíduos), energia mecânica (álcool combustível e bio-óleos) e energia elétrica (pela combustão, gaseificação e queima de gases). A forma de propagação do capim-elefante é preferencialmente vegetativa, através de estacas, e a espécie é conhecida por produzir sementes de baixa germinação, o que dificulta a expansão em grandes áreas. Dessa forma, torna-se necessário avançar no conhecimento a respeito da biologia reprodutiva e gerar conhecimento para auxiliar a seleção de genótipos superiores nos programas de melhoramento do capim-elefante. O objetivo deste trabalho foi estimar a taxa de cruzamento do capim-elefante a fim de entender o comportamento reprodutivo na espécie. Para este estudo, 18 indivíduos pertencentes ao Programa de Melhoramento de Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite foram selecionados, e sementes foram coletadas. 20 mudas descendentes de uma mesma planta foram escolhidas, tendo uma população final de 378 indivíduos. Foi inicialmente extraído o DNA de todos os indivíduos, e as regiões de interesse foram amplificadas por PCR. Testes foram realizados com dezenove marcadores microssatélites, e seis obtiveram sucesso na amplificação e na presença de bandas polimórficas. Foi gerado um dendrograma com os parentais para identificar relações de parentesco entre os indivíduos amostrados, que mostrou uma baixa similaridade, sendo a maioria dos parentais com índices menores do que 0,75. Além disso, a AMOVA revelou que 86% da variabilidade da população está presente dentro das progênies, resultado que está de acordo com espécies predominantemente alógamas. A alogamia foi confirmada com resultados da estimativa da taxa de cruzamento: a taxa multilocus, de 0,957; a taxa unilocus, de 0,900; a taxa de autofecundação, de 0,043, além de apresentar coeficiente de endogamia de -0,200 e correlação de paternidade de 0,045, demonstrando que há maior presença de heterose e que são poucos os indivíduos que são irmãos completos. Os resultados apresentados são importantes para o entendimento do tipo de cruzamento presente na espécie e auxiliarão na definição de novas estratégias nos programas de melhoramento.

Palavra-chave: *Cenchrus purpureus*; taxa de cruzamento; microssatélite; alogamia.

ABSTRACT

The Napier grass (*Cenchrus purpureum*) is a perennial grass used as forage crop mainly in dairy cattle. Nowadays, the Napier grass has been used as energy feedstock, due to high biomass yield, producing thermal energy (direct combustion, charcoal and residues), mechanical energy (biofuels and bio-oils) and electrical energy (through gas combustion, gasification and burn). *C. purpureum* is, preferably, a vegetative propagation species, that reproduces through stems. Its seeds have low quality, making difficult its expansion in extensive areas. Thus, it is necessary to extend the knowledge about the reproductive biology and selection of superior genotypes in Napier grass breeding programs. The aim of this study was to estimate the outcrossing rate of Napier grass in order to understand the reproductive behavior of this species. For that, 378 individuals were selected and divided in 18 parental and its progenies groups. DNA was extracted from all individuals and selected microsatellite regions were amplified by PCR. A total of 19 microsatellite markers were tested and six were successful in the amplification of polymorphic DNA bands. A dendrogram was generated with parental individuals to identify the relationship among them and a low similarity (<0.75) was found. AMOVA revealed 86% of variability within progenies which correlates with species predominantly alogamic. The allogamy was confirmed through analysis of outcrossing rate: the multilocus rate (0.957), unilocus rate, (0.900), selfing rate (0.043), inbreeding coefficient (-0.200), and correlation of paternity (0.045). These results indicate that heterosis is present and few individuals share the same parental origin. These findings are important to understand the outcrossing rate in this species and may help to define new strategies in breeding programs.

Keywords: *Cenchrus purpureus*; outcrossing rate; microsatellite; allogamy.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1.	Marcadores microssatélites utilizados na amplificação de <i>Cenchrus purpureus</i> , suas sequências <i>forward</i> e <i>reverse</i> , fluorescência utilizada em cada primer, temperatura de ligação (TA), motivo de repetição, tamanho do fragmento esperado e referência. Adaptado de Azevedo <i>et al.</i> (2012).	31
Tabela 2.	Número e tamanho dos amplicons identificados por meio dos marcadores microssatélites nos indivíduos parentais e progênes de <i>Cenchrus purpureus</i> , pertencentes ao Programa de Melhoramento de Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite. Marcadores microssatélites selecionados a partir do trabalho de Azevedo <i>et al.</i> (2012).	34
Figura 1.	Dendrograma obtido pelo algoritmo UPGMA de 18 parentais de <i>Cenchrus purpureus</i> pertencentes ao Programa de Melhoramento de Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite.	36
Tabela 3.	AMOVA de uma população de <i>Cenchrus purpureus</i> constituída por 18 famílias oriundas de parentais pertencentes ao Programa de Melhoramento do Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite. GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados.	37
Figura 2.	Gráfico de porcentagens de Variância Molecular obtido através do programa GenAlEx de uma população pertencente ao Programa de Melhoramento de Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite.	37
Tabela 4.	Estimativa de parâmetros relacionados à taxa de cruzamento de 18 famílias de <i>Cenchrus purpureus</i> pertencente ao Programa de Melhoramento do Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite.	38

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

°C: grau Celsius

µL: microlitro

µM: micromolar

AFLP: “Amplified Fragment Length Polymorphism” – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados

AMOVA: “Analysis of Molecular Variance” – Análise de Variância Molecular

C:N : relação Carbono:Nitrogênio

cm: centímetros

CTAB: “cetyl trimethylammonium bromide” – brometo de cetiltrimetilamônio

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: “Deoxyribonucleid acid” – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfato

DP: desvio padrão

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GE: “General Electric”

GenAIEx: “Genetic Analysis in Excel” – Análise Genética no Excel

M: molar

mg: miligramas

MgCl₂: cloreto de magnésio

min: minutos

mL: mililitros

MLTR: “Multilocus Mating System Program”

mm: milímetros

mM: milimolar

ng: nanograma

NTSYS: “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System” – Taxonomia Numérica e Sistema de Análise Multivariada

pb: pares de bases

RAPD: “Random Amplified Polymorphic Deoxyribose” – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

RFLP: “Restriction Fragment Length Polymorphism” – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição

s: segundo

SSR: “Simple Sequence Repeat” – Repetição de Sequências Simples (Microssatélites)

TA: temperatura de ligação

Taq: *Thermus aquaticus*

UPGMA: “Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean”

v/v: volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. TIPOS DE CRUZAMENTO EM PLANTAS.....	13
1.2. USO DE MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DE TAXAS DE CRUZAMENTO	15
1.3. CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO <i>Cenchrus</i> E DA ESPÉCIE <i>Cenchrus purpureus</i>	17
1.4. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DE CAPIM-ELEFANTE	21
1.5. MELHORAMENTO GENÉTICO DE <i>Cenchrus purpureus</i>	24
2. OBJETIVOS	28
2.1. OBJETIVO GERAL.....	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. MATERIAL VEGETAL	29
3.2. EXTRAÇÃO DE DNA.....	29
3.3. AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM MARCADORES MICROSSATÉLITES	30
3.4. DETECÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA	32
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1. AMPLIFICAÇÃO DO DNA COM MARCADORES MICROSSATÉLITES	34
4.2. DIVERSIDADE GENÉTICA.....	35
4.3. TAXA DE CRUZAMENTO EM CAPIM-ELEFANTE	38
5. DISCUSSÃO	39
5.1. MARCADORES MICROSSATÉLITES EM CAPIM-ELEFANTE	39
5.2. DIVERSIDADE GENÉTICA	40
5.3. SISTEMA DE CRUZAMENTO	41
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

As forrageiras são de grande importância para o cenário agrícola brasileiro, pois são as principais fontes de alimento para os bovinos. As áreas de pastagens representam 48,1% do total da área dos estabelecimentos agropecuários no Brasil (IBGE, 2006). Dada essa importância, há um grande interesse no desenvolvimento de forrageiras mais produtivas e de melhor qualidade, que proporcionem aumento da produtividade de carne e leite sem a necessidade de expansão de área. Entre as diversas espécies forrageiras que podem contribuir para esse aumento de produtividade, destaca-se o capim-elefante (*Cenchrus purpureus*), conhecido pelo elevado potencial de produção de biomassa, fácil adaptação aos diversos ecossistemas e boa aceitação pelos animais (MACHADO *et al.*, 2016).

O capim-elefante também é considerado como uma alternativa de destaque entre as culturas energéticas, em razão da sua eficiência fotossintética (mecanismo C4 de fixação de carbono), alto potencial produtivo, perenidade, rápido crescimento, ampla adaptação, capacidade de fixação biológica de nitrogênio, além de suas propriedades químicas (ANDERSON *et al.*, 2008a,b; MORAIS *et al.*, 2009; ZENG-HUI E HONG-BO, 2010; ROCHA *et al.*, 2017).

Para atender as necessidades de cultivares com características específicas, a Embrapa Gado de Leite possui um programa de melhoramento da espécie. Iniciada na década de 1990, o mesmo tem como objetivo obter cultivares para os diferentes sistemas de produção, como cultivares melhoradas para o corte, pastejo e, nos últimos anos, como fonte de bioenergia (MACHADO *et al.*, 2016). No programa de melhoramento, são necessárias informações gerais sobre a espécie, como a sua forma de reprodução e de propagação. Essas características são de grande importância para estimar parâmetros genéticos, compreender os padrões de fluxo gênico e a diferenciação genética entre e dentro de populações (BAWA, 1974; CLEGG, 1980; HAMRICK, 1989; VENCOVSKY *et al.*, 2001).

O capim-elefante é conhecido por ser uma espécie de propagação vegetativa, por meio de estacas. A propagação por sementes é limitada pelo fato da

espécie produzir sementes com variáveis níveis de fertilidade, sendo sua maioria de baixa germinação e plantas com baixo vigor (PEREIRA *et al.*, 2010). Ainda não se sabe as causas da ineficiência da propagação por sementes na espécie.

Uma informação básica, porém muito importante para tentar entender o problema da baixa germinação de sementes é a determinação da taxa de cruzamento. Algumas técnicas podem ser utilizadas, pois fornecem uma maneira de inferir a estrutura da relação entre os indivíduos (LYNCH E RITLAND, 1999; BLOUIN, 2003). Os marcadores morfológicos, por meio da análise das flores e do comportamento de polinizadores, foram usados há muito tempo para entender o comportamento reprodutivo de espécies vegetais (HAYES, 1918). Atualmente, os marcadores moleculares, como os microssatélites, são considerados informativos para o estudo da taxa de cruzamento.

As informações obtidas sobre a taxa de cruzamento do capim-elefante são importantes para o desenvolvimento de cultivares que possam ser propagadas por meio de sementes. Com o aumento da demanda por biomassa de capim-elefante para produção de energia e para pastejo, o lançamento de cultivares propagadas por sementes auxiliará na expansão das áreas cultivadas.

1.1. Tipos de Cruzamento em Plantas

O sistema reprodutivo das plantas é o ponto principal na análise de organização genética das populações. É um dos mais importantes traços da história de vida de espécies vegetais (DJÉ *et al.*, 2004; MEROTTO JÚNIOR, JASIENIUK E FISCHER, 2009), determinando os padrões pelos quais os gametas são transportados de geração para geração, controlando as distribuições das frequências genotípicas e o potencial de recombinação das populações (ALLARD, 1971; LOPES, BRUCKNER E LOPES, 2002). O estudo do sistema reprodutivo também pode fornecer informações importantes sobre os padrões de cruzamentos, a dinâmica dos processos microevolucionários, e as melhores formas para a conservação e manejo dessas espécies (OLIVEIRA, CARVALHO E ROSADO, 2002).

As plantas exibem uma variedade de sistemas de cruzamento, que incluem autofecundação e cruzamento entre indivíduos (BAYE E BECKER, 2004). Esses sistemas podem ser afetados por fatores não genéticos, como o vento, a densidade vegetal, a posição das flores na planta, sua coloração e morfologia, o comportamento do polinizador e a abundância floral da planta (BECKER, DAMGAARD E KARLSSON, 1992; CHARLESWORTH E WRIGHT, 2001; VARASSIN, TRIGO E SAZIMA, 2001; PARZIES *et al.*, 2008). Brown, Zohary e Nevo (1978) e Chaudhary, Jana e Acharya (1980) relataram que condições de alta precipitação e ambiente frio podem promover a fecundação cruzada em cevada, uma planta tipicamente autógena. Em condições de diferentes intensidades luminosas, Demotes-Mainard, Doussinault e Meynard (1995) e Li *et al.* (1996) relataram a mudança do comportamento reprodutivo do trigo e do arroz, de autofecundação para o cruzamento entre indivíduos. Já os fatores genéticos que alteram o comportamento reprodutivo são a apomixia, a protoginia, a protandria, autoincompatibilidade e a macho esterilidade. Alguns indivíduos podem apresentar, ao longo de sua vida, um sistema de cruzamento misto, com características autógenas e alógenas.

As dispersões do pólen feitas por polinizadores e as dispersões das sementes são mecanismos importantes no fluxo gênico de plantas alógenas (MEROTTO JÚNIOR, JASIENIUK E FISCHER, 2008). Plantas alógenas são aquelas que realizam preferencialmente polinização cruzada, e são caracterizadas pela

heterozigose, apresentando heterose e endogamia. Alguns mecanismos são responsáveis em facilitar a alogamia, como a protandria, a protoginia, a monoícia, e outros mecanismos determinam a alogamia nas espécies, como a dioícia, a autoincompatibilidade, e a macho esterilidade (BORÉM E MIRANDA, 2013).

A endogamia é um sistema que promove o aumento da homozigose nas descendências, e é favorecida pelo cruzamento entre indivíduos aparentados. A endogamia pode tanto ressaltar alelos dominantes, que trazem características importantes para as gerações de um indivíduo, como pode aumentar a homozigose de alelos recessivos deletérios, reduzindo a taxa de reprodução e de sobrevivência de uma espécie. Com isso, informações acerca de cruzamentos entre parentes são de extrema importância para a conservação genética (MORAES E SEBBENN, 2011; GAINO *et al.*, 2011).

A autofecundação é a união de produtos de diferentes meioses do mesmo indivíduo, e faz com que a heterozigose caia pela metade dentro da progênie em cada geração, diminuindo a diversidade dentro da população e aumentando a diferenciação entre as populações, com polimorfismo global geralmente baixo (GODT E HAMRICK, 1991; ENJALBERT E DAVID, 2000; THOMPSON E RITLAND, 2006). As plantas autógamas desenvolveram alguns mecanismos que auxiliam na autofecundação, como a cleistogamia, polinização do estigma antes da abertura do botão floral ou da antese, comum em soja (BORÉM E MIRANDA, 2013).

1.2. Uso de Marcadores Moleculares no Estudo de Taxas de Cruzamento

Os marcadores morfológicos, como a análise morfológica das flores, experimentos em casa de vegetação e a observação do comportamento do polinizador (CLEGG, 1980), foram usados há muito tempo para identificar cruzamento entre indivíduos ou autofecundação em genótipos maternos conhecidos (HAYES, 1918). Porém, esta técnica possui suas limitações, como o longo tempo necessário para o florescimento e a interferência de fatores ambientais no fenótipo final (GJURIC E SMITH JUNIOR, 1996).

A maneira mais rápida e eficiente para estimar a taxa de cruzamento é utilizando marcadores genéticos analisados nas progênes (BAYE E BECKER, 2004), como os marcadores moleculares, que auxiliam na estimação da taxa de cruzamento em diversas populações de plantas (BAYE E BECKER, 2004; THOMPSON E RITLAND, 2006; MUCHUGI *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2010; BRESSAN *et al.*, 2013). Os marcadores moleculares são geralmente usados baseando-se em um “modelo de cruzamento misto”, no qual assume-se que as progênes são resultado tanto de autofecundação como de cruzamento entre indivíduos (SHAW E ALLARD, 1979; MEROTTO JÚNIOR, JASIENIUK E FISCHER, 2009).

Diversos marcadores moleculares como as isoenzimas, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Random Amplified Polymorphic Deoxyribose (RAPD), marcadores microssatélites (SSR), e Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) são usados para avaliar a variação genética e o parentesco entre indivíduos de uma mesma espécie a nível molecular. Entretanto, a utilidade de marcadores moleculares depende da quantidade de DNA, do custo dos marcadores, das técnicas laboratoriais, do tempo necessário para o processamento, do grau de polimorfismo, da precisão das estimativas de distâncias genéticas e da acurácia das análises estatísticas (KANDEL *et al.*, 2016). Muitos marcadores moleculares possuem limitações associadas a eles, como o RAPD e AFLP que, devido ao comportamento dominante, fornecem menos informação por *locus* do que os marcadores codominantes (GAIOTTO, BRAMUCCI E GRATTAPAGLIA, 1997). As taxas de cruzamento têm sido tradicionalmente estudadas usando marcadores

codominantes, como as izoenzimas e microssatélites, devido ao seu alto polimorfismo alélico (CHAIX *et al.*, 2003; ADUGNA, SWEENEY E BEKELE, 2013).

Os marcadores microssatélites são uma subcategoria de repetições em tandem, que constituem regiões repetitivas no genoma, e também são evolutivamente importantes devido a sua instabilidade. Eles podem sofrer mutações em uma frequência entre 10^3 a 10^6 a cada geração de células (VIEIRA *et al.*, 2016). São encontrados em procariotos e eucariotos, amplamente distribuídos por todo o genoma, especialmente em eucromatinas de eucariotos, e em regiões codificantes e não codificantes de DNA nuclear e organelar (PÉREZ-JIMENEZ *et al.*, 2013; PHUMICHAJ, PHUMICHAJ E WONGKAEW, 2015; VIEIRA *et al.*, 2016).

Atualmente, se considera que a ocorrência de SSR é pequena em regiões gênicas, devido ao fato de que os SSRs possuem alta taxa de mutação, que pode comprometer a expressão gênica. Estudos indicam que em regiões codificantes, há uma predominância de SSRs com motivos de sequência dos tipos tri- e hexanucleotídeos (ZHANG *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2016).

Os microssatélites têm sido os marcadores mais utilizados para genotipagem de plantas nos últimos 20 anos, pois são altamente informativos, codominantes, e são marcadores genéticos multi-alélicos que são experimentalmente reproduzíveis e transferíveis entre espécies relacionadas (MASON, 2015; VIEIRA *et al.*, 2016). Em particular, os SSRs são usados para espécies selvagens em estudos de diversidade medidos com base na distância genética, para estimar fluxo gênico e taxa de crossing over, e em estudos evolutivos, sobretudo para inferir relações genéticas infraespecíficas (VIEIRA *et al.*, 2016). Para plantas cultivadas, os microssatélites são comumente usados para construção de mapas de ligação gênica, mapeamento de *loci* envolvidos em *locus* de caracteres quantitativos (QTL), estimativa do grau de parentesco entre genótipos, e seleção assistida por marcadores (JONAH *et al.*, 2011; KALIA *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2016). Estes marcadores têm sido particularmente utilizados para gerar mapas integrados em espécies de plantas na qual famílias de irmãos completos são usadas para construção de mapas de ligação gênica (GARCIA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2016), fornecendo aos melhoristas e geneticistas uma ferramenta para ligar as variações genéticas e as fenotípicas (MAMMADOV *et al.*, 2012; HAYWARD *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2016).

1.3. Caracterização do gênero *Cenchrus* e da espécie *Cenchrus purpureus*

O capim-elefante foi inicialmente descrito e classificado taxonomicamente como *Pennisetum purpureum* Schumach (STAPT E HUBBARD, 1934; PEREIRA *et al.*, 2016a), e após as mudanças no gênero, foi proposta a mudança na denominação da espécie para *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone. Atualmente, é considerada pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae e gênero *Cenchrus* L. (PEREIRA *et al.*, 2016a).

Os gêneros *Cenchrus* e *Pennisetum* foram considerados por muitos anos como intimamente relacionados (VERLOOVE, 2012; VELDKAMP, 2014), e as características descritas para a divisão dos gêneros estão ligadas aos tipos de cerdas que rodeiam as espiguetas (DELISLE, 1963; WATSON E DALLWITZ, 1992; SYAMALADEVI, MEENA E NAGAR, 2015). Porém, nenhuma dessas características foram consideradas suficientes para distinguir os gêneros (WEBSTER, 1988; SYAMALADEVI, MEENA E NAGAR, 2015). Alguns estudos baseando-se na filogenética molecular tentaram esclarecer a relação entre *Cenchrus* e *Pennisetum* (VERLOOVE, 2012; VELDKAMP, 2014). Donadio *et al.* (2009) confirmaram a proximidade entre os gêneros, além do fato de que as espécies descritas para *Cenchrus* estavam incluídas em *Pennisetum*. Já Chemisquy *et al.* (2010) avaliaram 51 espécies pertencentes a oito gêneros da subfamília Panicoideae, *Cenchrus*, *Pennisetum*, *Odontelytrum*, *Ixophorus*, *Paspalidium*, *Setaria*, *Stenotaphrum* e *Rupichloa*. A árvore consenso revelou que os gêneros *Pennisetum*, *Cenchrus* e *Odontelytrum* possuem um clado fortemente suportado, além de todas as espécies de *Cenchrus* e *Pennisetum* formarem um grupo monofilético. Os resultados filogenéticos presentes neste estudo suportam fortemente a unificação de *Cenchrus* e *Pennisetum* em um único gênero, como previamente sugerido por Correll e Johnston (1970), além da inclusão do gênero *Odontelytrum*.

Fundamentados nesses estudos, taxonomistas propuseram a existência apenas do gênero *Cenchrus*, composto pelo conjunto das espécies dos três gêneros, *Cenchrus*, *Pennisetum* e *Odontelytrum* (CHEMISQUY *et al.*, 2010; GUTIÉRREZ,

2015; PEREIRA *et al.*, 2016a). Além disso, também foi sugerida nova nomenclatura para as espécies antes pertencentes aos gêneros *Pennisetum* e *Odontelytrum* (PEREIRA *et al.*, 2016a).

Identificada no início do século XX pelo Coronel Napier (BENNET, 1976; CAVALCANTE E LIRA, 2010), o capim-elefante ocorre naturalmente em uma extensa área da África Ocidental, principalmente nos territórios de Guiné, Moçambique, Angola, Zimbábue e sul do Quênia, sendo esta região considerada como o centro de origem e de diversidade genética do capim-elefante (FERREIRA E PEREIRA, 2005; CAVALCANTE E LIRA, 2010). No Brasil, a espécie foi introduzida nos anos de 1920 e 1921, nos estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo, com mudas trazidas dos Estados Unidos e de Cuba (CAVALCANTE E LIRA, 2010). A maioria dos genótipos do capim-elefante existentes no Brasil estão representados no Banco Ativo de Germoplasma de Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite (BAGCE) (PEREIRA *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2016). Esse banco é um dos mais completos do país, contém vários acessos do gênero, como clones e populações de genótipos melhorados, silvestres e raças cromossômicas obtidas por cruzamentos interespecíficos (MACHADO *et al.*, 2016).

A espécie é uma gramínea perene, de hábito e crescimento cespitoso, atingindo de dois a seis metros de altura. Apresenta caules do tipo colmos, eretos, cilíndricos, glabros e cheios. Touceiras com numerosos perfilhos, podendo alcançar um metro de diâmetro. Possuem de 3,5 cm a seis metros de altura, com colmos de 20 ou mais internódios, de 15 cm a 20 cm de comprimento e de 1,5 cm a três centímetros de diâmetro. As plantas apresentam rizomas curtos, folhas com inserções alternas, de coloração verde escura, clara ou púrpura, que podem ser pubescentes ou não, chegando a alcançar dez centímetros de largura e 110 cm de comprimento. Também apresentam nervura central larga e brancacenta, bainha lanosa, invaginante, fina e estriada, lígula curta, brancacenta e ciliada. Sua inflorescência é uma panícula primária e terminal, sedosa e contraída, ou seja, com racemos espiciformes, cilíndrica, reta, podendo ser solitária ou aparecendo em conjunto no mesmo colmo. A panícula tem, em média, 15 cm de comprimento, formada por espiguetas envolvidas por um tufo de cerdas de tamanhos desiguais e de coloração amarelada e púrpura. A planta apresenta abundante lançamento de perfilhos aéreos e basilares, podendo formar

densas touceiras, apesar de não cobrirem totalmente o solo (NASCIMENTO JUNIOR, 1981; ALCÂNTARA E BUFARAH, 1983; DERESZ, 1999b; PEREIRA *et al.*, 2016a).

C. purpureus pode ser encontrado em diversos tipos de ambientes. Está presente desde o nível do mar até 2200 metros de altitude, sendo mais adaptado a altitudes de até 1500 metros (ALCÂNTARA E BUFARAH, 1983). É tolerante a seca, podendo ser encontrado em regiões com variação térmica de 18 a 30°C e precipitação de 800 a 4000 m, e floresce em diferentes condições de solos, como em barrancos de rios, regiões úmidas e orlas de florestas. A espécie é conhecida pela alta taxa fotossintética e eficiência no uso da água, pela característica das folhas estreitas e eretas que permitem maior penetração da luz através do perfil vegetal (ALCÂNTARA E BUFARAH, 1983; ANDERSON *et al.*, 2008b; KANDEL *et al.*, 2016), além de ser uma planta de fácil manejo, alto perfilhamento, alto teor de proteína bruta, e resistência a pragas e doenças (SUNDARAM *et al.*, 2009; KANDEL *et al.*, 2016).

O capim-elefante, segundo análises citológicas de megaesporogênese e do desenvolvimento do saco embrionário, é uma espécie predominante alógama, com alto nível de heterozigose. Além disso, já foi descrita a protoginia na espécie, com intervalo médio de sete dias entre o aparecimento dos estigmas e a abertura das primeiras anteras (HANNA, 1994; PEREIRA *et al.*, 1997). A propagação vegetativa é a forma mais comum de propagação, pois as sementes são geralmente de baixa germinação e plantas com baixo vigor (PEREIRA *et al.*, 2010).

Diferentes cultivares de capim-elefante melhoradas são encontradas, apresentando vantagens significativas em relação às cultivares tradicionais. As principais cultivares de capim-elefante são: BRS Capiapu, BRS Kurumi, BRS Canará, Pioneiro, Napier, Mineiro, Cameroon, Roxo Botucatu e Paraíso (PEREIRA *et al.*, 2016a).

O capim-elefante é alotetraploide, com $2n=4x=28$ (BRUNKEN, 1997; DAVIDE *et al.*, 2007; SILVA, 2011), e apresenta um dos seus genomas parcialmente homólogo ao do milheto (*Cenchrus americanus*, $2n=2x=14$). O cruzamento entre estas duas espécies é relativamente simples e resulta na obtenção de um híbrido interespecífico estéril, com boas características forrageiras e que pode ser mantido por meio de propagação vegetativa (SILVA, 2011). A espécie apresenta número básico cromossômico $x=7$ (MANARA, 1973; JAUHAR, 1981; SILVA, 2011), tendo evoluído para um alotetraploide ($2n=4x=28$), com comportamento diploide normal, que

possui os genomas A'A'BB (JAUHAR, 1981; SILVA, 2011), sendo que o primeiro destes apresenta grande homologia com o genoma A do milheto (DUJARDIN E HANNA, 1985; SILVA, 2011; REIS, 2016).

A espécie possui informações escassas com relação à sequência e mapa genético completo. Assim, são poucos os marcadores de sequência específica para a espécie, e estas não estão associadas a nenhuma característica específica. A geração de marcadores de sequência específica geralmente envolve alto custo para seu desenvolvimento e, na tentativa de reduzir o custo e trabalho, pesquisadores têm usado marcadores microssatélites de uma espécie para espécies e gêneros relacionados, e têm obtido sucesso na amplificação (BOWERS *et al.*, 1996; CORDEIRO *et al.*, 2001; KANDEL *et al.*, 2016). Assim como já relatado, o capim-elefante apresenta um dos seus genótipos homólogo ao milheto (JAUHAR, 1981), e grande número de marcadores microssatélites de milheto estão estabelecidos e disponíveis (ALLOUIS *et al.*, 2001; QI *et al.*, 2001; BUDAK *et al.*, 2003; QI *et al.*, 2004; MARIAC *et al.*, 2006; YADAV *et al.*, 2007; SENTHILVEL *et al.*, 2008; RAJARAM *et al.*, 2013). Os mesmos podem ser utilizados para a avaliação da transferabilidade espécie cruzada e diversidade genética em acessos de germoplasma de *Cenchrus purpureus* (AZEVEDO *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2016).

1.4. Importância econômica de capim-elefante

O capim-elefante é uma gramínea de grande aceitação na alimentação bovina (HANNA E SOLLENBERGER, 2007; YASUDA, ISHII E OHTA, 2014). A utilização da espécie como forrageira contribuiu para o aumento da produção de leite (DERESZ, 1999a) e de carne no Brasil (PEREIRA *et al.*, 2001; SOUZA SOBRINHO *et al.*, 2005). É uma planta que apresenta boa qualidade, palatabilidade, vigor, persistência e boa adaptação aos diversos tipos de solo, além de ter elevada produção de matéria seca (SOUZA SOBRINHO *et al.*, 2005) e grande eficiência fotossintética (SILVA, 2011). É uma forrageira com elevado potencial produtivo, podendo produzir até 50 toneladas de matéria seca por ano (PEREIRA *et al.*, 2016b). A espécie é usada frequentemente em regime de corte (capineiras), podendo ser utilizada também para ensilagem, picado verde e pastejo rotacionado (MOREIRA *et al.*, 2008; SILVA, 2011).

Em diversas regiões tropicais na Ásia, nas Américas, na Oceania, no Oriente Médio, na Austrália e em ilhas do Pacífico (WANG *et al.*, 2002; XIE *et al.*, 2009), a espécie está adaptada e é utilizada como quebra vento em plantações agrícolas (KARSCHON E HETH, 1958; XIE *et al.*, 2009), além de possuir capacidade de fitorremediação de materiais pesados (ISHII *et al.*, 2013; YASUDA *et al.*, 2014). Na África, esta planta é usada como palha, e os colmos finos são transformados em cercas e telas, e também como reforço para cabanas de barro. As folhas jovens e os brotos são usados na alimentação em sopas e guisados (BURKILL, 1994; XIE *et al.*, 2009), e extratos da planta são usados como diuréticos. O capim-elefante também é utilizado em diversos remédios herbais (BURKILL, 1994; XIE *et al.*, 2009), e na China, as cultivares de *Cenchrus purpureus* são utilizadas principalmente como forragem, como matéria-prima para papel, e como substrato de cultura para cogumelos (ZHOU, DONG E XIE, 2007; XIE *et al.*, 2009).

Cenchrus purpureus é conhecido por produzir grande volume de biomassa em curto período de tempo, e esta característica confere grande importância na produção de bioenergia (RENGSIRIKUL *et al.*, 2013; YASUDA *et al.*, 2014). Plantas que apresentam metabolismo C4 são caracterizadas por alta eficiência na conversão de luz em biomassa, alta eficiência no uso da água e no uso de nitrogênio nas folhas (TAYLOR *et al.*, 2010), permitindo grande acúmulo de matéria seca e de fibras.

No Brasil, em 2007, a biomassa, com participação de 31,1% na matriz energética, foi a segunda principal fonte de energia, superada apenas por petróleo e derivados. Ela ocupou a mesma posição entre as fontes de energia elétrica de origem interna, ao responder por 3,7% da oferta. A fonte energética só foi superada pela hidroeletricidade, que foi responsável pela produção de 77,4% da oferta total, segundo dados do Balanço Energético Nacional (BEN) de 2008 (ANEEL, 2008). Os derivados obtidos da biomassa dependem tanto da matéria-prima utilizada quanto da tecnologia de processamento para obtenção dos energéticos (ANEEL, 2008), podendo produzir energia elétrica, pela combustão direta; energia mecânica, como os biocombustíveis de primeira e segunda geração; energia térmica, como carvão vegetal e lenha. O uso da biomassa como fonte energética torna-se indispensável na atual perspectiva do esgotamento das reservas de fontes energéticas de origem fóssil, junto às previsões de mudança climática do planeta, apresentado no último relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC).

A produção de energia mecânica via biomassa está vinculada principalmente ao etanol de primeira geração (1G), produzido a partir do processamento do colmo, ou seja, do caule da planta que possui açúcares que podem ser fermentados. São fontes de matéria-prima a cana-de-açúcar, milho e trigo. Essas culturas também são amplamente usadas como fontes de alimentos, o que aumenta a competição do uso da matéria-prima, trazendo um significativo impacto nos preços dos alimentos e na segurança alimentar (NAIK *et al.*, 2010). Devido a esse problema, novas tecnologias para o processamento de biomassa estão sendo empregadas, como a utilizada para a produção do etanol de segunda geração (2G). Este biocombustível é gerado a partir do processamento do bagaço, da palha e das folhas de espécies como a cana-de-açúcar e o capim-elefante. A matéria-prima utilizada é a lignocelulose, composta por três frações principais: celulose (~45% do peso seco), hemicelulose (~30% do peso seco), e lignina (~25% do peso seco) (WISELOGEL, TYSON E JOHNSON, 1996; ZALDIVAR, NIELSEN E OLSSON, 2001), sendo esta molécula importante na constituição da estrutura fibrosa dos vegetais. A lignocelulose é encontrada em todas as partes das plantas, desde as raízes até as folhas. Assim, a produção do biocombustível a partir desta molécula consegue aproveitar tanto subprodutos descartados de processos envolvendo culturas de cana-de-açúcar como a alta produtividade de matéria seca do capim-elefante. Por isso, nos últimos anos, o

etanol 2G gerado tem sido visto como uma forma de reaproveitamento da matéria orgânica (SALEMI, 2009; EISENTRAUT, 2010; CHENG E TIMILSINA, 2010; NYKO *et al.*, 2010; LOFRANO *et al.*, 2013) e como um combustível que pode ajudar tanto na redução de emissão de gases do efeito estufa (CLIFT, 2007; PARK E KIM, 2012; DOS REIS *et al.*, 2013; MENEGOL *et al.*, 2014a,b) quanto no consumo de combustíveis fósseis no setor de transporte (MENEGOL *et al.*, 2014 a,b; RAMOS *et al.*, 2015).

Apesar das vantagens apresentadas, a produção de etanol 2G apresenta alguns desafios. O Brasil é considerado como uma das cinco potências no desenvolvimento do biocombustível de segunda geração, e o único país sul-americano a investir neste tipo de tecnologia. O país tem capacidade para produzir 10 bilhões de litros de etanol 2G até 2025, e esta marca só será atingida se houver investimentos na adaptação e construção de novas unidades industriais e um ambiente regulatório ajustado às circunstâncias e necessidades deste segmento. Essa projeção foi apontada no estudo “Secondy Generation Biofuels Markets: State of Play, Trade and Developing Country Perspectives” feito pela Conferência das Nações Unidas para o Comércio e Desenvolvimento (UNCTAD), que trata a respeito do futuro do etanol 2G no Brasil (RAÍZEN, 2017).

Também usada como fonte de energia térmica, a biomassa é queimada diretamente em caldeiras, e a energia resultante é utilizada na produção do vapor. Este vapor pode acionar as turbinas usadas no trabalho mecânico requerido nas unidades de produção e também aquelas utilizadas para geração de energia elétrica. Além disso, o vapor que seria liberado na atmosfera após a realização desses processos pode ser encaminhado para o atendimento das necessidades térmicas do processo de produção (ANEEL, 2008). Atualmente, o capim-elefante é vista como uma espécie alternativa de lenha ecológica, por meio de um processo de compactação que o transforma em briquetes ou péletes. Em indústrias de cerâmicas no Brasil, a espécie está sendo utilizada e testada para abastecer as caldeiras, como uma forma de diminuir gastos e contribuir para o meio ambiente (EMBRAPA, 2017).

O uso do capim-elefante, como fonte de bioenergia, requer a seleção de materiais genéticos com características diversas daquelas tradicionalmente contempladas para a alimentação animal (LÉDO E MACHADO, 2013; PEREIRA *et al.*, 2016a). Características como alta relação carbono/nitrogênio, elevado potencial de produção de biomassa e baixos teores de proteína são alguns dos requisitos para que

a energia derivada desta biomassa seja de boa qualidade e com mínimo consumo de energia fóssil (MCKENDRY, 2002; QUESADA *et al.*, 2004; JARADAT, 2010; REIS, 2016; PEREIRA *et al.*, 2016b).

1.5. Melhoramento genético de *Cenchrus purpureus*

O capim-elefante é uma espécie amplamente cultivada por todo o Brasil, e se destaca das outras forrageiras pelo potencial de produção, valor nutritivo e versatilidade de utilização (PEREIRA *et al.*, 2016b). No entanto, a expansão da área cultivada é limitada pelo custo do uso da propagação vegetativa, por meio de estacas, visto que a maioria das cultivares produz sementes de baixa germinação (PEREIRA *et al.*, 2001, 2003, 2010; REIS, 2016). Além disso, a propagação por estacas contribui para o aumento do custo de transporte e plantio da forrageira, dificultando uma melhor distribuição das cultivares melhoradas (PEREIRA *et al.*, 2003; SOUZA SOBRINHO *et al.*, 2008).

Buscando obter novas combinações gênicas para atender à demanda nacional por cultivares de forrageiras superiores, a Embrapa Gado de Leite desenvolve desde 1991 um programa de melhoramento genético do capim-elefante (PEREIRA *et al.*, 2010). A empresa mantém um Banco Ativo de Germoplasma de Capim-Elefante (BAGCE), que possui 173 acessos. Destes, 101 acessos são de *Cenchrus purpureus*, 40 acessos de *Cenchrus americanus*, 19 acessos de espécies do *pool* gênico terciário pertencente ao antigo gênero (*Pennisetum spp.*) e 13 raças cromossômicas, que são híbridos interespecíficos de *C. purpureus* x *C. americanus* (MACHADO *et al.*, 2016). A obtenção de cultivares que possam ser propagadas por sementes agregando características como maior velocidade de crescimento, maior produtividade, melhor qualidade nutricional, tolerância a solos de baixa fertilidade, distribuição mais equitativa da produção de matéria seca durante o ano e resistências a cigarrinhas das pastagens tem sido um dos objetivos dos programas de melhoramento dessa forrageira (PEREIRA *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2010; REIS, 2016).

O melhoramento da maioria das características de importância forrageira do capim-elefante pode ser conseguido por meio da exploração da variabilidade

existente na própria espécie (melhoramento intravarietal) (PEREIRA *et al.*, 2010). A hibridação entre cultivares/acessos de capim-elefante inicia-se com a escolha dos genitores, que deve ser feita com base na complementação alélica e na divergência genética, com o intuito de combinar cultivares que apresentam caracteres complementares. Uma alternativa é a seleção recorrente, o qual se baseia no aumento da frequência de genes favoráveis, resultando em uma população superior à original. Considerando que as cultivares de capim-elefante são constituídas por clones, desta forma, a etapa inicial da seleção recorrente é obter uma população de ampla base genética para posteriormente iniciar o processo de seleção. Pode-se obter esta população por meio de intercruzamento de diferentes fontes de germoplasma selecionadas com base em critérios, como superioridade agrônômica, diversidade genética e complementação alélica (PEREIRA *et al.*, 2001; SILVA, 2011). Depois de obtida a variedade de elevada performance, realiza-se a propagação vegetativa, garantindo a preservação das características genéticas a cada geração, ou o desenvolvimento de populações em equilíbrio genético propagadas por sementes (SILVA, 2011).

Considerando a capacidade do capim-elefante de trocar alelos com outras espécies do mesmo gênero, o programa de melhoramento também pode recorrer à utilização de germoplasmas de espécies pertencentes a conjuntos gênicos próximos, tais como o milheto (PEREIRA *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2010). Na formação dos híbridos, o milheto contribui com caracteres como vigor, resistência à seca e tolerância a doenças, qualidade forrageira e tamanho das sementes, enquanto a rusticidade, competitividade, perenidade e elevada produtividade de massa seca são conferidas pelo capim-elefante (DIZ, 1994; JAUHAR E HANNA, 1998; PEREIRA *et al.*, 2010).

Burton (1942) foi o primeiro a descrever sobre o híbrido triploide proveniente do cruzamento do capim-elefante com o milheto. Esse híbrido é considerado o mais importante desse gênero por apresentar produção e qualidade forrageiras similares ou superiores a de seus genitores. O híbrido interespecífico pode ser facilmente produzido por polinização manual e ser propagado vegetativamente ou por meio de sementes comerciais, podendo ser produzidas utilizando uma variedade de milheto macho-estéril citoplasmática (pms) (OSGOOD, HANNA E TEW, 1997; JAUHAR E HANNA, 1998; PEREIRA *et al.*, 2010).

Segundo Pereira e Ferreira (1999), híbridos triploides têm apresentado grande variabilidade para caracteres de importância forrageira, já tendo sido selecionadas forrageiras com 23% de proteína bruta nas folhas, valor este superior à média de 16% encontrada no capim-elefante. Entretanto, a maior limitação em relação à utilização do híbrido triploide é a infertilidade, o que constitui uma barreira para o programa de melhoramento genético. O número de cromossomos não balanceados é apontado como a principal causa da esterilidade, pois o híbrido reúne 21 cromossomos pertencentes aos genomas A oriundos do milho e A' e B, do capim-elefante. A restauração da fertilidade desses híbridos permitiria que estes voltassem ao programa de melhoramento genético, transferindo alelos de características desejadas ao capim-elefante (PEREIRA *et al.*, 2010).

Nesse sentido, a alternativa para resgatar a fertilidade é promover a duplicação. Hanna (1981) e Hanna *et al.* (1984) produziram, por meio da exposição de *seedlings* à solução de colchicina 0,2% e 0,05% por 24 horas, respectivamente, um híbrido hexaploide ($2n=6x=42$) com meiose regular, que apresenta sementes maiores e vigorosas quando comparadas com as minúsculas sementes de baixo vigor do capim-elefante (PEREIRA *et al.*, 2010).

Atualmente, as cultivares obtidas apresentam características diversas, levando em conta o potencial de produção, o valor nutritivo, e o objetivo de uso e de manejo requerido para se obter o melhor desempenho econômico (PEREIRA *et al.*, 2016a). As principais cultivares de capim-elefante são:

- BRS Capiaçú: cultivar lançada pela Embrapa em outubro de 2016, destacando-se pela alta produtividade e qualidade da forragens, resistência ao tombamento e boa adaptação ao corte mecanizado, e produção de silagem de boa qualidade, sendo considerada uma alternativa mais barata em comparação com o milho;

- BRS Kurumi: cultivar lançada pela Embrapa em 2012, recomendada para uso sob rotação rotacionada, picado verde ou silagem, caracterizando-se por apresentar elevada produção de forragem de alto valor nutricional e excelente arquitetura para pastejo;

- BRS Canará: cultivar lançada pela Embrapa em 2012, sendo indicada para cultivo como capineira e uso como picado verde ou silagem. Apresenta alta

produtividade de forragem e se adapta aos Biomas Cerrado, Mata Atlântica e Amazônia;

- Pioneiro: cultivar lançada pela Embrapa em 1996. Caracteriza-se pelo intenso lançamento de perfilhos aéreos e basais, possibilitando uma recuperação mais rápida dos piquetes depois do pastejo. Utilizada em sistema de lotação rotacionada, podendo também ser usada como picado verde ou silagem. Indicada para cultivo nas regiões Sudeste e Sul;

- Napier: primeira variedade de capim-elefante introduzida no Brasil, sendo cultivada em todo o país. A cultivar Napier se encontra entre as melhores em termos de produção de forragem, tendo-se registro de produção de até 37 toneladas de matéria seca por hectare por ano. Pode ser utilizada nos sistemas de corte e pastejo;

- Mineiro: cultivar obtida pela seleção entre progênies da cultivar Napier, sendo umas das mais tradicionais e com maior área cultivada. Apresenta elevada capacidade de produção de matéria seca e perfilhamento vigoroso, com predominância dos lançamentos aéreos;

- Cameroon: cultivar introduzida no Brasil na década de 1960, alcançando rápida popularidade pelo rendimento e vigor dos perfilhos basais, sendo indicada para formação de capineiras. Apresenta elevado potencial de produção, podendo atingir até 40 toneladas de matéria seca por hectare por ano;

- Roxo Botucatu: cultivar introduzida da República do Togo, apresenta folhas de coloração roxa. A cultivar apresenta colmos grossos, plantas altas, touceiras abertas e pouco densas, sendo susceptível ao acamamento;

- Paraíso: híbrido resultante do cruzamento interespecífico entre o capim-elefante e o milheto, sendo a primeira cultivar propagada por meio de sementes lançada no mercado brasileiro. Apesar disso, sua produtividade é inferior à dos clones de propagação vegetativa melhorados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estimar a taxa de cruzamento em capim-elefante (*Cenchrus purpureus*) por meio do uso de marcadores microssatélites, auxiliando na escolha de estratégias eficientes para o Programa de Melhoramento do Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite.

2.2. Objetivos Específicos

1. Estimar a porcentagem de plantas geradas por meio de autofecundação e de cruzamentos em *Cenchrus purpureus*;
2. Verificar a existência de variações na taxa de cruzamento entre indivíduos;
3. Avaliar a diversidade genética entre os indivíduos selecionados pertencentes ao Programa de Melhoramento de Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite;
4. Estimar a variância molecular (AMOVA) da população final selecionada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

A população utilizada no presente trabalho foi formada a partir do cruzamento entre 59 materiais do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante que apresentavam características de interesse. A progênie obtida a partir desse cruzamento foi selecionada ao longo de 3 ciclos de seleção. Dessa forma, a população que estava no campo em 2015 durante a etapa de coleta de sementes fazia parte do terceiro ciclo de seleção. Dezoito indivíduos de capim-elefante (*Cenchrus purpureus*) pertencentes a essa população do Programa de Melhoramento da Embrapa Gado de Leite foram selecionados, e suas sementes coletadas. Em seguida, as sementes foram plantadas, e 20 mudas provenientes de um mesmo indivíduo foram selecionadas, compondo a progênie deste indivíduo. Ao final, foi formada uma população com 378 indivíduos.

3.2. Extração de DNA

O DNA de todos os 378 indivíduos selecionados foi extraído. Para cada planta, aproximadamente 300 mg de folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido ou picotadas em um microtubo de 2 mL contendo tampão de lise. A extração de DNA foi realizada utilizando a técnica de CTAB (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1995), com modificações. A concentração e a qualidade do DNA foram estimadas por leitura em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

3.3. Amplificação de DNA com marcadores microssatélites

Dezenove marcadores microssatélites foram testados para amplificação do DNA das amostras de *Cenchrus purpureus*. Esses marcadores foram originalmente identificados no genoma do milho (ALLOUIS *et al.*, 2001; BUDAK *et al.*, 2003), e Azevedo *et al.* (2012) testaram a viabilidade destes marcadores em capim-elefante. Os pares de primers utilizados foram conjugados com corantes fluorescentes (FAM, HEX, TAMRA) no grupamento fosfato da porção 5' dos primers *forward*.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada em um volume final de 10 µL como descrito: 1X GoTaq reaction buffer (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 0,8 µM de cada primer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), 1 unidade de GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 5% (v/v) de DMSO, e 45 ng de DNA genômico. As reações em cadeia da polimerase foram realizadas em termociclador Veriti (Life Technologies, California, EUA) com o seguinte perfil: desnaturação inicial a 95°C (15 min), seguido de 5 ciclos a 94°C (30 s), temperatura de ligação específica de cada primer (90 s), e 72°C (1 min), com decréscimo de 1°C na temperatura de ligação por ciclo; 25 ciclos a 94°C (30 s), temperatura de ligação específica de cada primer (90 s), e 72°C (1 min); e um ciclo final de extensão de 60 min a 60°C.

Os marcadores selecionados no teste de amplificação foram então submetidos à eletroforese capilar, realizado com os dezoito parentais. Nesta etapa foram avaliados a capacidade de amplificação (qualidade da reação, presença de picos inespecíficos e falhas na amplificação) e o polimorfismo dos marcadores utilizados. Foram desconsiderados aqueles que se apresentavam monomórficos ou com baixo polimorfismo.

De 19 pares de primers testados no estudo de Azevedo *et al.* (2012), seis apresentaram as características desejadas para o estudo, como boa amplificação e polimorfismo (Tabela 1), sendo estes utilizados para genotipagem de todos os 378 indivíduos de capim-elefante.

As amostras de todos os 378 indivíduos de capim-elefante foram feitas em duplicatas, para confirmar os resultados obtidos e para identificar alelos de indivíduos que apresentaram falhas na amplificação por PCR.

Os produtos da amplificação foram precipitados utilizando-se acetato de amônio 2,5 M e etanóis 70% e 96%, ressuspendidos em água Milli-Q e mantidos congelados a -20°C até o uso.

Tabela 1. Marcadores microssatélites utilizados na amplificação de *Cenchrus purpureus*, suas sequências *forward* e *reverse*, fluorescência utilizada em cada primer, temperatura de ligação (TA), motivo de repetição, tamanho do fragmento esperado e referência. Adaptado de Azevedo *et al.* (2012).

Nome Marcador	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	Fluorescência	Motivo repetição	TA (°C)	Tamanho (pb)	Referência
M04	GCTGCATCGGAG ATAGGGAA	CTCAGCAA GCACGCTG CTCT	HEX	(CT) ₈	52	210	BUDAK <i>et al.</i> (2003).
M31	CATCTAAACACAA CCAATCTTGAAC	TGGCACTC TTAAATTGA CGCAT	FAM	(TG) ₃₄	54	264	ALLOUIS <i>et al.</i> (2001).
M33	AAAGTGAATACGA TACAGGAGCTGA G	CATTTACAGC CGTTAAGT GAGACAA	HEX	(AG) ₃₃	50	238	ALLOUIS <i>et al.</i> (2001).
M34	CAAGGATGGCTG AAGGGCTATG	TTTCCAGCC CACACCAG TAATC	FAM	(GA) ₁₇	58	181	ALLOUIS <i>et al.</i> (2001).
M35	GGAAGGCCTAGG GATCAATCTCAC	ATCCACCC GACGAAGG AAACGA	HEX	(GA) ₁₆	60	241	ALLOUIS <i>et al.</i> (2001).
M42	CAGCAGCGAGAA GTTTAGCA	GCGTAGAC GGCGTAGA TGAT	TMR	(AGC) ₈	60	250	MARIAC <i>et al.</i> (2006).

3.4. Detecção dos fragmentos de DNA

Os produtos dos testes de amplificação iniciais foram detectados por eletroforese capilar, usando o sequenciador de DNA MegaBACE 1000 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Utilizou-se o padrão de tamanho de DNA GeneTab 500 (GENE ID, São Carlos, Brasil). A análise de tamanho foi realizada com o software Fragment Profile (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

Os dados finais foram exportados para uma planilha do software Excel (Microsoft Corporation, Albuquerque, EUA). Em cada amostra, apenas os fragmentos mais intensos e reprodutíveis foram marcadas e incluídas na análise.

3.5. Análises estatísticas

O coeficiente de similaridade de Jaccard foi calculado e utilizado para construir a matriz de similaridade dos parentais. Além disso, a partir do cálculo foi permitido construir um dendrograma de acordo com o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*). Todas as análises computacionais foram realizadas com o software NTSYSpc (ROHLF, 2000). O cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard foi baseado na fórmula $S_j = \frac{a}{(a+b+c)}$, em que a = presença de banda nos indivíduos A e B; b = presença de banda no indivíduo B, mas não em A; c = presença de banda no indivíduo A, mas não em B (MEYER, 2002). As análises de bootstraps foram realizadas usando o software PAST 2.17 (HAMMER, HARPER E RYAN, 2001), e os valores foram adicionados nos ramos do dendrograma.

As análises de variância molecular (AMOVA) foram realizadas por meio do software GenAlEx 6.5 (PEAKALL E SMOUSE, 2012) para avaliar a variação entre e dentro das progênies amostradas.

A taxa de cruzamento foi estimada utilizando o programa MLTR 3.1 (RITLAND, 2004), por meio de um modelo que considera que as progênies geradas são resultadas tanto de fecundação cruzada como de autofecundação. O programa permite obter a taxa de cruzamento multilocus (t_m), sendo esta a fração de polinizações resultantes de fecundação cruzada; taxa de cruzamento unilocus (t_s), que

é estimada para cada *locus* separadamente; a taxa de autofecundação, dada pela fórmula $s = 1 - t_m$; a taxa de cruzamentos entre aparentados, representado pela fórmula $t_m - t_s$; o coeficiente de endogamia (F); e a correlação de paternidade (r_p), que estima o número de irmãos completos, ou seja, embriões que compartilham o mesmo doador de pólen.

4. RESULTADOS

4.1. Amplificação do DNA com Marcadores Microssatélites

Dezenove pares de primers foram testados para avaliar a amplificação do DNA dos 18 indivíduos parentais, provenientes do Programa de Melhoramento do Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite. Destes marcadores, seis pares apresentaram polimorfismo para os indivíduos testados. Aqueles que não apresentaram polimorfismo, entre os indivíduos parentais, foram desconsiderados.

Ao todo, foram detectados por eletroforese capilar 42 alelos (Tabela 2), e estes foram utilizados para analisar a variância molecular das progênies e estabelecer a taxa de cruzamento da população estudada de capim-elefante. Entre os parentais, 27 dos 42 alelos foram identificados, e os mesmos foram utilizados para a construção do dendrograma.

Tabela 2: Número e tamanho dos amplicons identificados por meio dos marcadores microssatélites nos indivíduos parentais e progênies de *Cenchrus purpureus*, pertencentes ao Programa de Melhoramento de Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite. Marcadores microssatélites selecionados a partir do trabalho de Azevedo *et al.* (2012).

Marcador	Número de alelos identificados	Tamanho dos amplicons (pb)
M04	7	230, 232, 243, 253, 258, 265, 270
M31	9	220, 224, 226, 230, 232, 236, 238, 244, 246
M33	5	183, 191, 193, 210, 213
M34	5	158, 162, 164, 166, 168
M35	10	171, 185, 187, 191, 193, 204, 206, 208, 214, 220
M42	6	231, 233, 236, 247, 251, 262

4.2. Diversidade Genética

O dendrograma relativo aos indivíduos parentais está representado na Figura 1. Dois grupos principais foram formados, sendo o primeiro grupo constituído de 14 indivíduos, e o segundo grupo com quatro indivíduos. A similaridade entre os indivíduos foi maior no primeiro grupo, que apresentou indivíduos com 0,75 de similaridade, os parentais 11 e 13, e similaridade entre os indivíduos 4 e 19, de 0,72. Já para o segundo grupo, a similaridade é menor comparada ao primeiro grupo. Os indivíduos 9 e 14 apresentaram coeficiente de similaridade de aproximadamente 0,56, e similaridade de 0,50 entre os indivíduos 2 e 3.

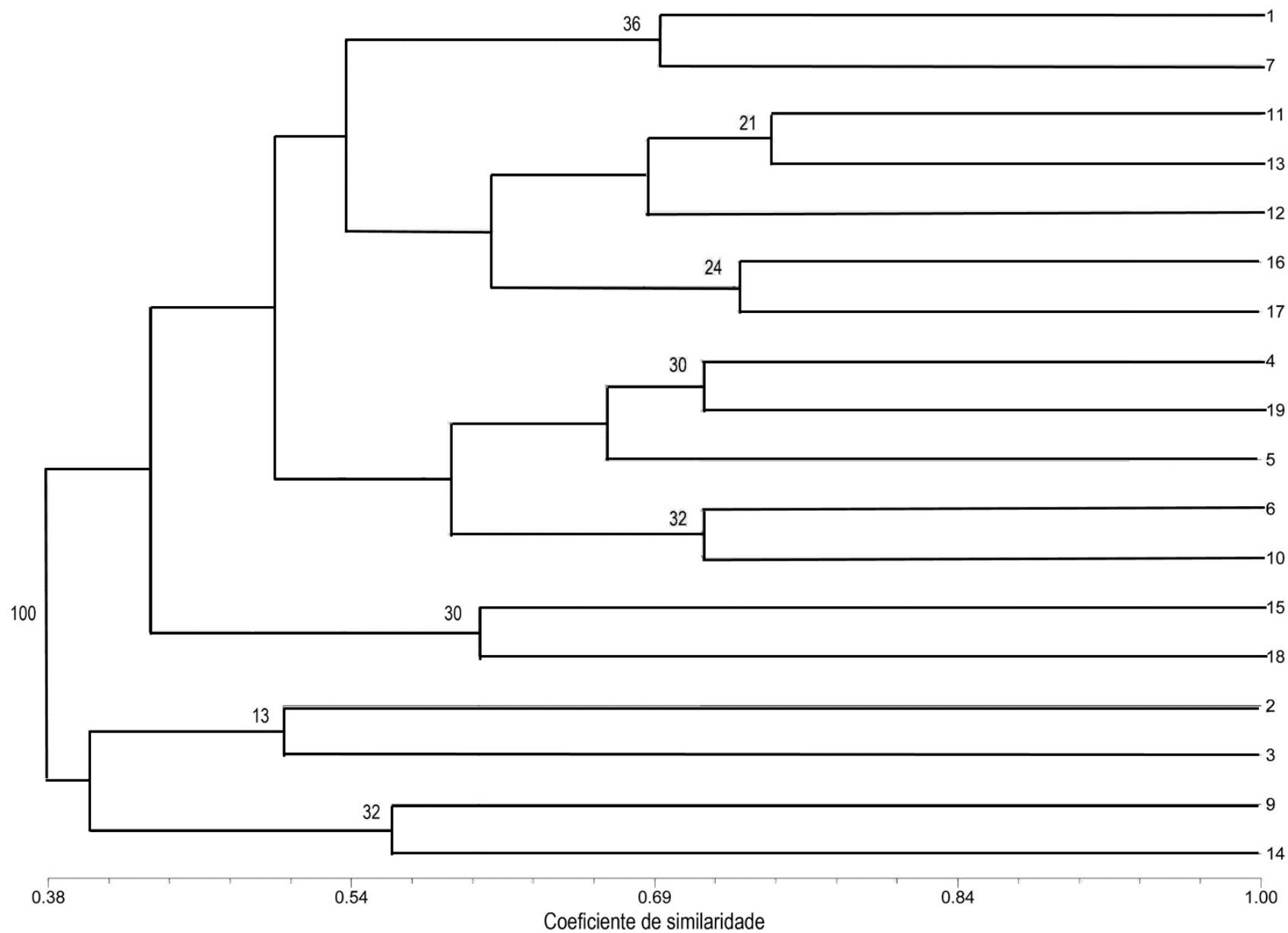


Figura 1: Dendrograma obtido pelo algoritmo UPGMA de 18 parentais de *Cenchrus purpureus* pertencentes ao Programa de Melhoramento de Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite.

Os resultados das análises de variância molecular demonstraram que 14% desta variância ocorre entre as progênes, e que 86% ocorre dentro das mesmas (Figura 2 e Tabela 3).

Tabela 3: AMOVA de uma população de *Cenchrus purpureus* constituída por 18 famílias oriundas de parentais pertencentes ao Programa de Melhoramento do Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite. GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados.

	GL	SQ	MQ	Variância	%
Entre Progênes	17	578,571	34,034	1,251	14%
Dentro Progênes	360	2796,619	7,768	7,768	86%
Total	377	3375,190		9,019	100%

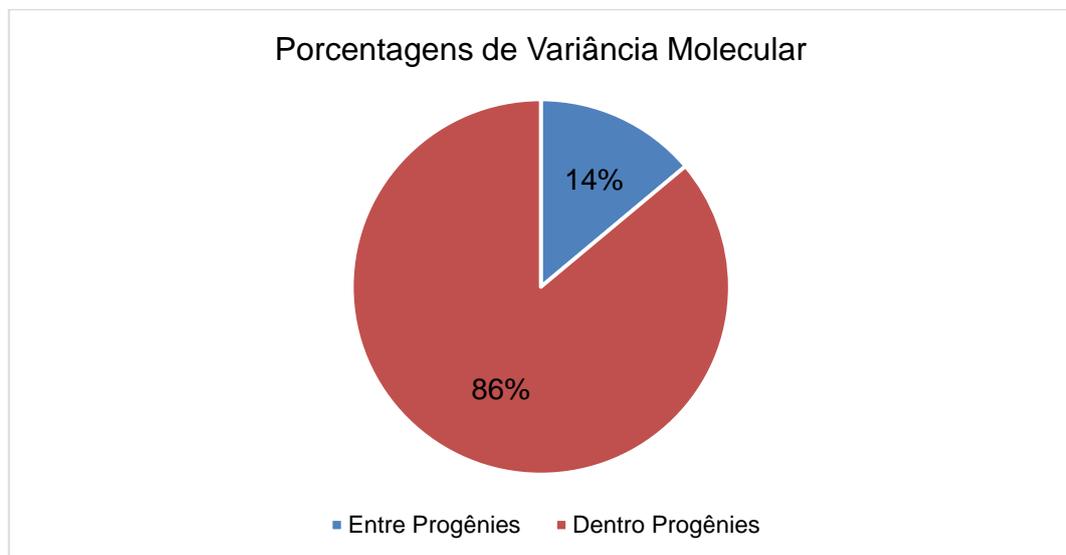


Figura 2: Gráfico de porcentagens de Variância Molecular obtido através do programa GenAlEx de uma população pertencente ao Programa de Melhoramento de Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite.

4.3 Taxa de cruzamento em capim-elefante

A estimativa da taxa de cruzamento (Tabela 4) da população estudada, feita a partir dos alelos identificados (Tabela 2), revelou que a taxa multilocus (t_m) foi de $0,953 \pm 0,027$, e a taxa unilocus (t_s) foi de $0,895 \pm 0,026$. A diferença entre as taxas de cruzamento multilocus e unilocus ($t_m - t_s$) foi de $0,058 \pm 0,022$, indicando que não houve cruzamentos endogâmicos na população. O coeficiente de endogamia, o valor F , foi de $-0,200 \pm 0,005$, e a correlação de paternidade, r_p , foi de $0,045 \pm 0,014$.

Tabela 4: Estimativa de parâmetros relacionados à taxa de cruzamento de 18 famílias de *Cenchrus purpureus* pertencente ao Programa de Melhoramento do Capim-Elefante da Embrapa Gado de Leite.

	População (\pm DP)
Número de plantas mãe	18
Número de progênes	360
Taxa cruzamento multilocus (t_m)	0,953 (\pm 0,027)
Taxa cruzamento unilocus (t_s)	0,895 (\pm 0,026)
Taxa de autofecundação ($s = 1 - t_m$)	0,047
Diferenças entre taxas de cruzamento ($t_m - t_s$)	0,058 (\pm 0,022)
Coeficiente de Endogamia (F)	-0,200 (\pm 0,005)
Correlação de paternidade (r_p)	0,045 (\pm 0,014)

5. DISCUSSÃO

5.1. Marcadores Microssatélites em capim-elefante

Os marcadores utilizados neste presente estudo foram selecionados a partir do trabalho de Azevedo *et al.* (2012), no qual foi testada a transferabilidade de marcadores desenvolvidos a partir do genoma de milho em capim-elefante. Assim como no estudo citado, os marcadores foram eficientes na capacidade de amplificação e grau de polimorfismo entre os indivíduos da população selecionada em nosso trabalho. Essas informações sugerem mais uma vez que há similaridades entre as espécies, e provavelmente, as regiões do genoma amplificadas se mantêm conservadas em *C. purpureus* e *C. americanus* (AZEVEDO *et al.*, 2012; KENDAL *et al.*, 2016).

Após a seleção dos marcadores, outra questão surgiu com relação aos alelos identificados nos indivíduos amostrados. Os marcadores microssatélites são conhecidos por serem marcadores codominantes e unilocus, permitindo a detecção de um ou dois alelos por *locus* em cada indivíduo. Porém, *Cenchrus purpureus*, como já foi relatado, é uma espécie tetraploide ($2n=4x=28$) que pode apresentar múltiplos alelos, tornando mais complexa a análise para *locus* específico (ANDREW *et al.*, 2003). Sendo assim, o número de cópias de um alelo para uma dada posição alélica pode não ser detectado (ANDREW *et al.*, 2003). Devido a essa complexidade, foi necessário transformar as informações alélicas em uma matriz de presença e ausência de alelos. Dessa forma, ao se transformar os dados de alelos em uma matriz de 0 e 1, as informações acerca dos efeitos de dosagem alélica nos indivíduos não foi obtida, não permitindo assim conhecer a contribuição de cada alelo em um determinado *locus*.

5.2. Diversidade Genética

Neste trabalho, o coeficiente de Jaccard foi utilizado para esclarecer a diversidade genética dos indivíduos parentais. O coeficiente é calculado comparando-se o número de presenças de bandas comuns e o total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas (MEYER, 2002). Por ser um índice que calcula a similaridade presente entre os indivíduos, quanto menor os valores encontrados, mais distantes geneticamente os indivíduos serão (MEYER, 2002).

O dendrograma gerado a partir do índice de Jaccard revelou que há baixa similaridade genética entre os indivíduos. Os valores de similaridade variaram de 0,38 a 0,75, demonstrando que nesta população há variabilidade genética entre os indivíduos. Este resultado encontrado pode ser explicado pelo comportamento reprodutivo de capim-elefante, que é uma espécie predominantemente alógama (HANNA, 1994; PEREIRA *et al.*, 1997), e que tem como característica alta variabilidade genética (BORÉM E MIRANDA, 2013).

A identificação de baixos coeficientes de similaridade nos indica que os indivíduos não estão relacionados, e que os cruzamentos são realizados por indivíduos não aparentados. Essa característica encontrada na população é importante para guiar cruzamentos em um programa de melhoramento (AZEVEDO *et al.*, 2012). Em programas de melhoramento, há preferência por parentais que apresentam baixa similaridade genética, pois se espera que os mesmos produzam progênes com alta variação genética (MESSMER *et al.*, 1993; AZEVEDO *et al.*, 2012). Além disso, estes cruzamentos podem diminuir os riscos de vulnerabilidade genética, e elevar os patamares de produção (CHOTIYARNWONG *et al.*, 2007; KANDEL *et al.*, 2016).

O resultado da AMOVA demonstrou que há maior variância molecular dentro das progênes do que entre as progênes, resultado este observado em espécies alógamas, seja em populações naturais ou em coleções de germoplasma (FERREIRA *et al.*, 2012). Isto pode ser explicado pelo fato de que em populações alógamas, os cruzamentos entre os indivíduos são predominantes, e este comportamento reprodutivo permite o aumento de variabilidade genética dentro desta população. Estes indivíduos variam tanto entre si que, quando comparados a

indivíduos pertencentes a outra população, a variância é proporcionalmente menor, e os resultados da AMOVA apresentam maior porcentagem de variância dentro do que entre populações. Jena *et al.* (2014), estudando *Merope angulata*, uma espécie alógama, encontrou uma variância genética entre as populações de 7,74%, e dentro das populações, a variância foi de 92,26%. Já Sousa *et al.* (2012) investigaram o modo de reprodução de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*), e a análise de variância revelou variação entre os grupos de 64,38%, e baixo nível de variação foi encontrado dentro dos grupos, de 35,62%, resultado que corresponde a plantas autógamias, e que está de acordo com o sistema de cruzamento já descrito para a espécie.

5.3. Sistema de Cruzamento

A estimativa da taxa de cruzamento da população de estudo foi realizada a partir de um modelo, o qual assume que na população não houve seleção ou mutação seguido de fertilização, todos os genótipos se cruzam na mesma proporção para um pool de pólenes homogêneo, os alelos de diferentes *loci* segregam independentemente (RITLAND E JAIN, 1981), e os indivíduos podem realizar autofecundação ou fecundação cruzada (RITLAND, 2002).

O capim-elefante é descrito como uma espécie predominantemente alógama, e alguns fatores podem estar ligados a esse comportamento reprodutivo, como a protoginia das flores (HANNA, 1994; PEREIRA *et al.*, 1997). Os resultados obtidos a partir da estimativa da taxa de cruzamento de uma população representativa da espécie revelaram uma taxa multilocus de 0,953 e taxa unilocus de 0,895, valores que reafirmam a descrição de predominância de alogamia em capim-elefante (HANNA, 1994; PEREIRA *et al.*, 1997). Os valores similares e elevados de t_m e t_s encontrados nesta população são esperados em espécies com baixa endogamia, como foi relatado por Ferreira *et al.* (2010) e Souza *et al.* (2012).

Outras informações reveladas a partir da estimativa da taxa de cruzamento desta população corroboram o que até agora já foi visto. A taxa de autofecundação, o coeficiente de endogamia e a taxa de cruzamento entre aparentados são valores que refletem o grau de cruzamentos entre indivíduos com genótipos semelhantes ou eventos de autofecundação. A taxa de autofecundação nesta população foi de 0,047,

mostrando que 4,7% das progênies da população final foi originada a partir de autofecundação. Comparada à taxa multilocus, que reflete a porcentagem de indivíduos gerados por fecundação cruzada, a taxa de autofecundação é baixa, e na população selecionada, há preferência pelos cruzamentos entre os indivíduos. O coeficiente de endogamia, de -0,2, sugere que nesta população estudada a heterozigose é mais presente entre os indivíduos, indicado principalmente pelo valor negativo encontrado (MUCHUGI *et al.*, 2008). Para a taxa de cruzamento entre aparentados, foi visto um valor de 0,058, indicando que 5,8% das progênies geradas foram de cruzamentos entre indivíduos intimamente relacionados (RITLAND, 2002; SINCLAIR *et al.*, 2014).

A correlação de paternidade (r_p) avalia os indivíduos das progênies que são gerados pelos mesmos genitores, materno e paterno, os chamados irmãos completos (SINCLAIR, *et al.*, 2014). As possíveis explicações para a ocorrência destes cruzamentos incluem: o comportamento dos polinizadores, com visitas sistemáticas de plantas próximas, e o assincronismo no florescimento dos parentais como genitores (MATIDA *et al.*). Para a população estudada, o valor encontrado foi de 0,045, mostrando que 4,5% dos indivíduos gerados são irmãos completos. Este dado nos sugere que o cruzamento biparental é relevante para as progênies do estudo (MEROTTO JÚNIOR, JASIENIUK E FISCHER, 2008), por apresentar valores diferentes de zero, e o conhecimento de que há irmãos completos em uma população é uma informação importante no estudo de espécies dentro de um programa de melhoramento, para a condução de estratégias que considera que a população estudada possa gerar irmãos completos.

Alguns estudos com espécies de importância econômica apresentaram resultados consistentes com o modelo de reprodução já conhecido para as espécies. O estudo com *Jatropha curcas* mostrou que a espécie possui um sistema reprodutivo misto, produzindo tanto sementes de cruzamento quanto de autofecundação. A taxa multilocus foi de 68%, o que indicou que a espécie produz sementes preferencialmente por cruzamento, e uma proporção de sementes são resultado de autofecundação (32%) (BRESSAN *et al.*, 2013).

Muchugi *et al.* (2008) avaliaram a taxa de cruzamento em *Warbugia ugandensis*, e os resultados apresentados foram semelhantes aos encontrados para o capim-elefante. O valor F foi de -0,2, valor negativo que indica excesso de

heterozigose nos indivíduos, e t_m de 0,889, indicando que a espécie é predominantemente alógama. Além disso, a diferença entre as taxas t_m e t_s foi de 0,023, valor que indica que houve menos probabilidade de cruzamento entre aparentados, além do valor baixo obtido pela correlação de paternidade, de 0,028.

Os resultados obtidos da taxa de cruzamento nos permitiu obter mais informações acerca do comportamento reprodutivo de capim-elefante, com enfoque principal na produção de sementes. Porém, estudos relacionando a produção de sementes com produção e viabilidade polínica, comportamento meiótico das células germinativas, e fatores abióticos são vistos na literatura e podem ajudar a compreender o que acontece em capim-elefante.

Li *et al.* (2008), estudando a baixa eficácia da reprodução sexual em *Spartina anglica*, detectaram que as altas taxas de aborto de sementes em populações naturais é principalmente devido a protoginia, baixa qualidade de pólen, limitação de pólenes no estigma, e pólenes ou tubos polínicos com formatos irregulares. Além disso, fatores abióticos desfavoráveis como altas temperaturas e chuva inibem a polinização e a germinação dos pólenes no estigma. Esses fatores, biológicos e abióticos, têm grande influência no tamanho da população natural da espécie na costa chinesa. Já a espécie *Chamaecyparis nootkatensis*, planta encontrada na região noroeste do Pacífico, é também conhecida pela baixa produção de sementes. Anderson *et al.* (2012) investigaram os fatores que afetam a produção de sementes, e detectaram que altas temperaturas influenciam na baixa viabilidade polínica, causando irregularidades no desenvolvimento de pólenes e aumento da esterilidade polínica, além de alterar o desenvolvimento de embriões. Além disso, foi relatado o efeito da autopolinização nas sementes, pois este mecanismo reduz a fertilidade e a produção das sementes, em comparação com a polinização cruzada.

6. CONCLUSÃO

- O dendrograma gerado a partir dos alelos presentes entre os parentais revelou uma baixa similaridade genética entre os indivíduos, o que é uma característica importante para programas de melhoramento de espécies vegetais;
- A análise de variância molecular revelou que dentro das progênies há maior variância do que entre progênies, resultado este esperado e encontrado em plantas alógamas;
- A taxa de cruzamento estimada confirmou a alogamia na espécie. Pode-se concluir que há predominância de cruzamentos, mas que uma pequena taxa de autofecundação ocorre;
- Este conhecimento mostra um ponto de partida para o melhoramento e seleção dos indivíduos com as melhores características para expandir o cultivo de capim-elefante por meio de sementes, sendo ainda necessários mais estudos para compreender a baixa germinação de sementes encontrada na espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, P.B.; BUFARAH, G. Plantas forrageiras: gramíneas e leguminosas. São Paulo: Editora Nobel, 1983.
- ALLARD, R. W. Princípios de melhoramento genético de plantas. São Paulo: E. Blücher, 1971.
- ALLOUIS, S.; QI, X.; LINDUP, S.; GALE, M.D.; DEVOS, K.M. Construction of a BAC library of pearl millet, *Pennisetum glaucum*. Theoretical and Applied Genetics, v. 102, p. 1200–1205, 2001.
- ANEEL. Biomassa. In: ANEEL. Atlas de Energia Elétrica no Brasil, p. 63-74, 2008.
- ANDERSON, W.; CASLER, M.; BALDWIN, B. Improvement of Perennial Forage Species as Feedstock for Bioenergy. In: VERMERRIS, W. (Ed.). Genetic Improvement of Bioenergy Crops, Springer, 2008a. p. 308-345.
- ANDERSON, W.F.; DIEN, B.S.; BRANDON, S.K.; PETERSON, J. Assessment of bermudagrass and bunch grasses as feedstocks for conversion to ethanol. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 145, p. 13–21, 2008b.
- ANDERSON, E.D.; OWENS, J.N.; COLANGELI, A.M.; RUSSELL, J.H. Challenges facing *Chamaecyparis nootkatensis* seed orchards: low seed production, pollen-cone abortion, self-pollination, and accelerated embryo development. Canadian Journal of Forest Research, v. 32, p. 1411-1419, 2012.
- ANDREW, R.L.; MILLER, J.T.; PEAKALL R.; CRISP, M.D.; BAYER, R.J. Genetic, cytogenetic and morphological patterns in a mixed mulga population: evidence for apomixis. Australian Systematic Botany, v. 16, p. 69-80, 2003.
- AZEVEDO, A.L.S.; COSTA, P.P.; MACHADO, J.C.; MACHADO, M.A.; PEREIRA, A.V.; LÉDO, F.J.S. Cross Species Amplification of *Pennisetum glaucum* Microsatellite Markers in *Pennisetum purpureum* and Genetic Diversity of Napier Grass Accessions. Crop Science, v. 52, p. 1776-1785, 2012.
- BAWA, K.S. Breeding systems of tree species for a lowland tropical community. Evolution, v. 28, p. 85- 92, 1974.
- BAYE, T.; BECKER, H.C. Natural outcrossing rate in *Vernonia galamensis*. Plant Breeding, v. 123, p. 398-399, 2004.

BECKER, H.C.; DAMGAARD, C. E KARLSSON, B. Environmental variation for outcrossing rate in rapeseed (*Brassica napus*). Theoretical and Applied Genetics, v. 84, p. 303-306, 1992.

BENNET, H.W. Pasto Johnson, pasto alfombra y otras gramíneas para el sur humedo de los Estados Unidos. In: HUGUES, H.D. *et al.* (Ed.). Forrajes. México, 1976. p. 321-324.

BLOUIN, M. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. Trends in Ecology and Evolution, v. 18, p. 503–511, 2003.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. Sistemas Reprodutivos de Espécies Cultivadas. In: _____. Melhoramento de Plantas. 6. ed. rev. e ampl. – Viçosa, MG: Editora UFV, 2013.

BOWERS, J.E.; DANGI, G.S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). Genome, v. 39, p. 628–633, 1996.

BRESSAN, E.A; SEBBENN, A.M; FERREIRA, R.R; LEE, T.S.G. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) exhibits a mixed mating system, high correlated mating and apomixes. Tree Genetics & Genomes, v. 9, p. 1089-1097, 2013.

BROWN, A.H.D.; ZOHARY, D.; NEVO, E. Outcrossing rates and heterozygosity in natural populations of *Hordeum spontaneum* Koch in Israel. Heredity, v. 41, p. 49–62, 1978.

BRUNKEN J.N. A systematic study of *Pennisetum* sect. *Pennisetum* (Gramineae). American Journal of Botany, v. 64, p. 161–176, 1977.

BUDAK, H.; PEDRAZA, F.; CREGAN, P.B.; BAENZIGER, P.S.; DWEIKAT, I. Development and utilization of SSRs to estimate the degree of genetic relationships in a collection of pearl millet germplasm. Crop Science, v. 43, p. 2284–2290, 2003.

BURKILL, H.M. The useful plants of West Tropical Africa. Royal Botanic Gardens, Kew, London, UK, 1994.

BURTON, G.W. A systematic study of some species in the Tribe Paniceae. American Journal of Botany, Columbus, v. 29, p. 335-361, 1942.

CAVALCANTE, M.; LIRA, M.A. Variabilidade Genética em *Pennisetum purpureum* Shumacher. Revista Caatinga, v. 23, n. 2, p. 153-163, 2010.

- CHAIX, G.; GERBER, S.; RAZAFIMAHARO, V.; VIGNERON, P.; VERHAEGEN, D.; HAMON, S. Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. *Theoretical Applied Genetics*, v. 107, p. 705–712, 2003.
- CHARLESWORTH, D.; WRIGHT, S.I. Breeding systems and genome evolution. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 11, n. 6, p. 685–690, 2001.
- CHAUDHARY, H.R.; JANA, S.; ACHARYA, S.N. Outcrossing rates in barley populations in the Canadian prairies. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 22, p. 353–360, 1980.
- CHEMISQUY, M.A.; GIUSSANI, L.M.; SCATAGLINI, M.A.; KELLOGG, E.A.; MORRONE, O. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. *Annals of Botany*, v. 106, p. 107-130, 2010.
- CHENG, J. J. E TIMILSINA, J. R. Advanced Biofuel Technologies: Status and Barriers. Policy Research Working Paper, p. 1-47, 2010.
- CHOTIYARNWONG, O.; CHATWACHIRAWONG, P.; CHANPRAME, S.; SRINIVES, P. Evaluation of genetic similarity in Thai indigenous and recommended soybean varieties by SSR markers. *Thai Journal of Agricultural Science*, v. 40, p. 119–126, 2007.
- CLEGG, M.T. Measuring plant mating systems. *BioScience*, v. 30, p. 814-818, 1980.
- CLIFT, R. Climate change and energy policy: the importance of sustainability arguments. *Energy*, v. 32, p. 262–268, 2007.
- CORDEIRO, G.M.; CASU, R.; MCINTYRE, C.L.; MANNERS, J.M.; HENRY, R.J. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. *Plant Science*, v. 160, p.1115–1123, 2001.
- CORRELL, D.S.; JOHNSTON, M.C. Manual of the vascular plants of Texas. Texas: Texas Research Foundation, Renner, 1970.
- DAVIDE, L.C.; TECHIO, V.H.; NUNES, J.D.; PEREIRA, A.V. Variação cromossômica numérica em *Pennisetum*. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n. 2, p. 398-405, 2007.
- DELISLE, D. Taxonomy and distribution of the genus *Cenchrus*. *Iowa State Journal of Science*, v. 37, p. 259-351, 1963.

- DERESZ, F. Capim-elefante manejado em sistema rotativo para produção de leite e carne. In: PASSOS, L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A.V. (Ed.). *Biologia e manejo do capim-elefante*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999a. p. 161-172.
- DERESZ, F. 1999b. Utilização do capim-elefante sob pastejo rotativo para produção de leite e carne. Juiz de Fora, Embrapa-CNPGL, 29p. (Circular técnica 54).
- DEMOTES-MAINARD, S.; DOUSSINAULT, G.; MEYNARD, J.M. Abnormalities in the male developmental program of winter wheat induced by climatic stress at meiosis. *Agronomie*, v. 16, p. 505–515, 1995.
- DIZ, D.A. Breeding procedures and seed production management in pearl millet x elephant grass hexaploid hybrids. Florida: University of Florida, 118 p. 1994.
- DJÉ, Y.; HEUERTZ, M.; ATER, M.; LEFÉ BVRE, C.; VEKEMANS, X. In situ estimation of outcrossing rate in sorghum landraces using microsatellite markers. *Euphytica*, v. 138, p. 205– 212, 2004.
- DONADIO, S.; GIUSSANI, L.M.; KELLOGG, E.A.; ZULOAGA, F.O.; MORRONE, O. A preliminar molecular phylogeny of *Pennisetum* and *Cenchrus* (Poaceae-Panicaceae) based on the *trnL-F*, *rpl16* chloroplast markers. *Taxon*, v. 58, p. 392-404, 2009.
- DOS REIS, L.; FONTANA, R.C.; DELABONA, P.S.; LIMA, D.J.S.; CAMASSOLA, M.; PRADELLA, J.G. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. *Bioresource Technology*, v. 46, p. 597–603, 2013.
- DUJARDIN, M. E HANNA, W.W. Cytology and reproductive behavior of pearl millet-napiergrass hexaploides x *Pennisetum squamulatum* trispecific hybrids. *Journal of Heredity*, v. 76, n. 5, p. 382-384, 1985.
- EISENTRAUT, A. Sustainable Production of Second-Generation Biofuels: Potential and perspectives in major economies and developing countries. Information Paper, p. 1-221, 2010.
- EMBRAPA. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2422024/pesquisa-investe-em-capim-como-fonte-de-energia>. Acesso em: 23 março 2017.

ENJALBERT, J.; DAVID, J.L. Inferring recent outcrossing rates using multilocus individual heterozygosity: application to evolving wheat populations. *Genetics*, v. 156, p. 1973-1982, 2000.

FERREIRA, M.E. E GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: DF, EMBRAPA-CENARGEN, 1995.

FERREIRA, C. B. B.; LOPES, M. T. G.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; MOREIRA, D. A.; BARROS, W. S.; MATIELLO, R. R. Diversidade genética molecular de progênies de dedenheiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n. 3, p. 378-384, 2012.

FERREIRA, T.G.T.; PENHA, H.A.; ZUCCHI, M.I.; SANTOS, A.A.; HANAI, L.R.; JUNQUEIRA, N.; BRAGA, M.F.; VENCOVSKY R.; VIEIRA M.L.C. 2010. Outcrossing rate in sweet passion fruit based on molecular markers. *Plant Breeding*, 2010.

FERREIRA, R.P. E PEREIRA, A.V. Melhoramento de forrageiras. In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 781-812.

GAINO, A.P.S.C.; MORAES, M.L.T.; MOREIRA, J.P.; CARDIN, L.T.; MORAES, M.A.; SILVA, A.M.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M. Mating system in *Myracrodruon urundeuva* (Anarcadiaceae): implications for conservation genetics. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 34, n. 4, p. 545-551, 2011.

GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M. E GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 95, p. 842-849, 1997.

GARCIA, F.A.A.; KIDO, A.E.; MEZA, N.A.; SOUZA, B.H.M.; PINTO, R.L.; PASTINA, M.M.; LEITE, S.C.; SILVA, G.J.A.; ULIAN, C.E.; FIGUEIRA, A.; SOUZA, A.P. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 112, p. 298-314, 2006.

GJURIC, R. E SMITH JUNIOR, S.R. Identification of cross-pollinated and self-pollinated progeny in alfalfa through RAPD nulliplex loci analysis. *Crop Science*, v. 36, p. 389-393, 1996.

GODT, M.J.W. E HAMRICK, J.L. Estimates of outcrossing rates in *Lathyrus latifolius* populations. *Genome*, v. 34, p. 988–992, 1991.

GUTIÉRREZ, H.F. The American species of the genus *Cenchrus* s.l. (Poaceae, Panicoideae, Paniceae). *Darwiniana*, v. 3, n. 1, p. 114-200, 2015.

- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, v. 4, n. 1, 9pp, 2001.
- HAMRICK, J.L. Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E. *Isozymes in plant biology*. Netherlands: Springer, 1989. p. 87-105.
- HANNA, W.W. Method of reproduction in napiergrass and in the 3X and 6X allopolyploid hybrids with pearl millet. *Crop Science*, Madinson, v. 21, p. 123-126, 1981.
- HANNA, W.W.; GAINES, T.P.; GONZALEZ, B.; MONSON, W.G. Effect of ploidy on yield and quality of pearl millet x napier grass hybrids. *Agronomy Journal*, Madinson, v. 76, n. 6, p. 969-971, 1984.
- HANNA, W.W. Elephantgrass improvement. In: ANAIS SIMPÓSIO SOBRE CAPIM-ELEFANTE, 2., 1994, Juiz de Fora. Embrapa-CNPGL. p. 1-47.
- HANNA, W.W. E SOLLENBERGER, L. E. Tropical and Subtropical Grasses. In: BARNES, R.F. (Ed.). *Forages*. 6. ed., Iowa USA: Blackwell Pub, 2007. p. 245-255.
- HARDY, O.J. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Molecular Ecology*, v. 12, p. 1577–1588, 2003.
- HAYES, H.K. Natural crossing in wheat: A cause of impurities in breeding plots. Belief of some agronomists that hybrids frequently revert to the parental type. *Journal of Heredity*, v. 9, p. 326–330, 1918.
- HAYWARD, A.C.; TOLLENAERE, R.; DALTON-MORGAN, J.; BATLEY, J. Molecular marker applications in plants. In: BATLEY, J. (Ed.) *Plant Genotyping*. Springer, New York, NY, p. 13-27, 2015.
- ISHII, Y.; HAMANO, K.; KANG, D. J.; RENGSIRIKUL, K.; IDOTA, S.; FUKUYAMA, K.; NISHIWAKI, A. C4-Napier grass cultivation for cadmium phytoremediation activity and organic livestock farming in Kyushu, Japan. *Journal of Agricultural Science and Technology*, v. 3, p. 321-330, 2013.
- JARADAT, A.A. Genetic resources of energy crops: Biological systems to combat climate change. *Australian Journal of Crop Science*, v. 4, n. 5, p. 309, 2010.
- JAUHAR, P.P. Cytogenetics of pearl millet. *Advances in Agronomy*, v. 34, p. 407-479, 1981.

JAUHAR, P.P. E HANNA, W.W. Cytogenetics and genetics of pearl millet. *Advances in Agronomy*, v. 64, p. 1-26, 1998.

JENA, S.N.; VERMA, S.; NAIR, K.N.; SRIVASTAVA, A.K.; MISRA, S.; RANA, T.S. Genetic diversity and population structure of the mangrove lime (*Merope angulata*) in India revealed by AFLP and ISSR markers. *Aquatic Botany*, v. 120, p. 260-267, 2014.

JONAH, P.; BELLO, L.; LUCKY, O.; MIDAU, A; MORUPPA, S. Review: the importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Global Journal of Science Frontier Research*, v. 11, eV-vers1, 2011.

KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: na overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, v. 177, p. 309-334, 2011.

KANDEL, R.; SINGH, H.P.; SINGH, B.P.; HARRIS-SHULTZ, K.; ANDERSON, W.F. Assessment of Genetic Diversity in Napier Grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) using Microsatellite, Single-Nucleotide Polymorphism and Insertion-Deletion Markers from Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.). *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 34, p. 265-272, 2016.

KARSCHON, R. E HETH, D. Wind speed, wind-borne salt and agricultural crops as affected by windbreaks. *La Yaaran*, v. 8, p. 8–13, 1958.

LÉDO, F.J.S. E MACHADO, J.C. Construção de um ideótipo de gramínea para produção de energia. In: SOUZA, F.H.D.; MATTA, F.P.; FÁVERO, A.P. (Ed.). *Construção de ideótipos de gramíneas para usos diversos*. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2013.

LI, H.; SHUQING, A.; ZHI, Y.; YAN, C.; ZHAO, L.; ZHOU, C.; DENG, Z.; SU, W.; LIU, Y. Protogynous, pollen limitation and low seed production reasoned for the dieback of *Spartina anglica* in coastal China. *Plant Science*, v. 174, p. 299-309, 2008.

LI, H.B.; ZHANG, Q.; LIU, A.M.; ZOU, J.S.; CHEN, Z.M. A genetic analysis of low-temperature-sensitive sterility in *Indica japonica* rice hybrid. *Plant Breeding*, v. 115, p. 305–309, 1996.

LOFRANO, R.C.Z.; COSTA, F.M.F.; OLIVEIRA, L.A.F.; OLIVEIRA, M.C.A. Métodos e Perspectivas Tecnológicas de Obtenção de Biocombustíveis de Primeira e Segunda Geração. *E-xacta*, v. 6, n. 1, p. 35-53, 2013.

LOPES, R.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, M.T.G. Estimação da taxa de cruzamento da aceroleira com base em dados isoenzimáticos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 3, p. 321-327, 2002.

LYNCH, M.; RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, v. 152, n. 4, p. 1753-1766, 1999.

MACHADO, J.C.; PEREIRA, A.V.; LÉDO, F.J.S.; KÖPP, M.M. Recursos energéticos de *Pennisetum*. In: DAVIDE, L.C. & BENITES, F.R.G. (Ed.) *Workshop sobre Citogenética e Genética Molecular Aplicadas ao Melhoramento*. 1. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2016. cap. 1, p. 9-15.

MAMMADOV, J.; AGGARWAL, R.; BUYRARAPU, R.; KUMPATLA, S. SNP markers and their impact on plant breeding. *International Journal of Plant Genomics*, p. 1-11, 2012.

MANARA, N.T.F. Citogenética de variedades de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). 1973. 63 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba.

MARIAC, C.; LUONG, V.; KAPRAN, I.; MAMADOU, A.; SAGNARD, F.; DEU, M.; CHANTEREAU, J.; GERARD, B.; NDJEUNGA, J.; BEZANÇON, G.; PHAM, J.L.; 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*, v. 114, p. 49–58, 2006.

MASON, A.S. SSR Genotyping. In: BATLEY, J. (Ed.) *Plant Genotyping*. Springer, New York, NY, p. 77-89, 2015.

MATIDA, E.T.; CHIARI, L.; RESENDE, R.M.S.; SANT'ANA, C. Taxa de Cruzamento em *Stylosanthes capitata* (Vogel) Estimada por RAPD.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. *Bioresource Technology*, v. 83, n. 1, p. 47-54, 2002.

MENEGOL, D.; SCHOLL, A.L.; FONTANA, R.C.; DILLON, A.J.P.; CAMASSOLA, M. Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. *Fuel*, v. 133, p. 232–240, 2014a.

MENEGOL, D.; SCHOLL, A.L.; FONTANA, R.C.; DILLON, A.J.P.; CAMASSOLA, M. Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic

hydrolysis in the presence of surfactants. *Energy Conversion and Management*, v. 88, p. 1252–1256, 2014b.

MEROTTO JÚNIOR, A.; JASIENIUK, M.; FISCHER, A.J. Estimating the outcrossing rate of *Cyperus difformis* using resistance to ALS-inhibiting herbicides and molecular markers. *Weed Research*, v. 49, p. 29–36, 2009.

MESSMER, M.M.; MELCHINGER, A.E.; HERRMANN, R.G.; BOPPENMAIER, J. Relationships among early European maize inbreds: II. Comparison of pedigree and RFLP data. *Crop Science*, v. 26, p. 672–676, 1993.

MEYER, A.S. Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes. 2002. 118p. Dissertação – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MORAES, M.L.T.; SEBBENN, A.M. Pollen dispersal between isolated trees in the Brazilian savannah: a case study of the Neotropical tree *Hymenaea stigonocarpa*. *Biotropica*, v. 40, p. 462-470, 2011.

MORAIS, R.F., SOUZA, B.J., LEITE, J.M., SOARES, L.H.B., *et al.* Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 44, p.133-140, 2009.

MOREIRA, P.C.M.; WASCHECK, R.C.; DUTRA, A.R.; GRANDSIRE, C., ALMEIDA, O.C.; MOREIRA, S.O.L.; OLIVERA, D.L. Utilização de capim-elefante para alimentação de bovinos. *Estudos*, v. 35, n. 3, p. 429-449, 2008.

MUCHUGI, A.; MULUVI, G.M.; SIMONS, A.J.; WACHIRA F.N.; JAMNADASS R.H. Estimation of outcrossing rate in a natural breeding population of *Warburgia ugandensis* using AFLP marker. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 139-146, 2008.

NAIK, S.N.; GOUD, V.V.; ROUT, P.K.; DALAI, A.K. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 578–597, 2010.

NASCIMENTO JÚNIOR, D. Informações sobre plantas forrageiras. Viçosa, MG: UFV-Imprensa Universitária, 1981. 56p.

NYKO, D.; GARCIA, J.L.F.; MILANEZ, A.Y.; DUNHAM, F.B. A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada. *Biocombustíveis*, v. 32, p. 5-48, 2010.

- OLIVEIRA, A.F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S.C.S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorfii* Desf. Na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 25, n. 3, p. 331-338, 2002.
- OSGOOD, R.V.; HANNA, W.W. E TEW, T.L. Hybrids seed production or pearl millet x napiergrass triploid hybrids. *Crop Science, Madinson*, v. 37, n. 3, p. 998-999, 1997.
- PARK, Y.C. E KIM, J.S. Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. *Energy*, v. 47, p. 31–35, 2012.
- PARZIES, H.K., NKE, C.F.; ABDEL-GHANI, A.H.; GEIGER, H.H. Outcrossing rate of barley genotypes with different floral characteristics in drought-stressed environments in Jordan. *Plant Breeding*, v. 127, p. 536—538, 2008.
- PEAKALL, R. E SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.
- PEREIRA, A.V.; BARRA, R.B.; ABREU, J.C.; FREITAS, V.P. Protogynous interval in elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Shum.). In: ANAIS DE XVIII INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 1997, Winnepeg – Canadá.
- PEREIRA, A.V. E FERREIRA, R.P. Genética e melhoramento de capim-elefante para pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999. Porto Alegre. Resumos... Porto Alegre: [s.n.], 1999.
- PEREIRA, A.V.; VALLE, C.B.; FERREIRA, R.P.; MILES, J.W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. Recursos genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. 1183p.
- PEREIRA, A.V. *et al.* Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L.L. *et al.* Recursos genéticos e melhoramento de plantas. Cuiabá: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.
- PEREIRA, A.V.; CRUZ, C.D.; FERREIRA, R.P.; BOTREL, M.A.; OLIVEIRA, J.S. Influências da estabilização de genótipos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* schum.) sobre a estimativa da repetibilidade de características forrageiras. *Ciência e Agrotecnologia, Lvras*, v. 26, n.4, p. 762-767, 2002.
- PEREIRA, A.V.; SOUZA SOBRINHO, F.; SOUZA, F.H.D.; LÉDO, F.J.S. Tendências do melhoramento genético e produção de sementes forrageira no Brasil. In:

SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, v. 4, 2003, Lavras. Anuais... Lavras: UFLA, 2003. p. 36-63.

PEREIRA, A.V.; AUAD, A.M.; LÉDO, F.J.S.; BARBOSA, S. *Pennisetum purpureum*. In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (Ed.) Plantas forrageiras. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2010. cap. 6, p. 197-219.

PEREIRA, A.V.; MORENZ, M.J.F.; LÉDO, F.J.S.; FERREIRA, R.P. Capim-elefante: Versatilidades de usos na pecuária de leite. In: VILELA, D.; FERREIRA, R.P.; FERNANDES, E.N.; JUNTOLLI, F.V. (Org.) Pecuária de leite no Brasil. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2016a. Parte 2, cap. 3, p. 187-211.

PEREIRA, A.V.; LEDO, F.J.S.; MORENZ, M.J.F.; LEITE, J.L.B.; SANTOS, A.M.B.; MARTINS, C.E.; MACHADO, J.C. BRS Capiaçú: cultivar de capim-elefante de alto rendimento para produção de silagem. Comunicado técnico 79, Juiz de Fora, MG. 6p. 2016b.

PEREIRA, G.S.; NUNES, E.S.; LAPERUTA, L.D.C.; BRAGA, M.F.; PENHA, H.A.; DINIZ, A.L.; MUNHOZ, C.F.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A.A.F.; VIEIRA, M.L.C. Molecular polymorphism and linkage analysis in sweet passion fruit, and outcrossing species: Molecular map in sweet passion fruit. *Annals of Applied Biology*, v. 162, p. 347-361, 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, M.; BESNARD, G.; DORADO, G.; HERNANDEZ, P. Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling. *PLoS One*, v. 8, e70507. 2013.

PHUMICHAJ, C.; PHUMICHAJ, T.; WONGKAEW, A. Novel chloroplast microsatellite (cpSSR) markers for genetic diversity assessment of cultivated and wild *Hevea* rubber. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 33, p. 1486-1498. 2015.

QI, X.; LINDUP, S.; PITTAWAY, T.S.; ALLOUIS, S.; GALE, M.D.; DEVOS, K.M. Development of simple sequence repeat markers from bacterial artificial chromosomes without subcloning. *BioTechniques*, v. 31, p. 355–362, 2001.

QI, X.; PITTAWAY, T.S.; LINDUP, S.; LIU, H.; WATERMAN, E.; PADI, F.K.; HASH, C.T.; ZHU, J.; GALE, M.D.; DEVOS, K.M. An integrated genetic map and a new set of simple sequence repeat markers for pearl millet, *Pennisetum glaucum*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 109, p.1485–1493, 2004.

QUESADA, D.M.; BODDEY, R.M.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S. Parâmetros Qualitativos de Genótipos de Capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.)

estudados para a produção de energia através da Biomassa. Circular técnica Embrapa, Seropédica, RJ, 2004.

RAÍZEN. Disponível em: <https://www.raizen.com.br/estudo-indica-potencial-do-brasil-para-produzir-10-bilhoes-de-litros-de-etanol-2g-ate-2025>. Acesso em: 15 março 2017.

RAJARAM, V.; NEPOLEAN, T.; SENTHILVEL, S.; VARSHNEY, R.K.; VADEZ, V.; SRIVASTAVA, R.K.; SHAH, T.M.; SUPRIYA, A.; KUMAR, S.; KUMARI, B.R.; BHANUPRAKASH, A.; NARASU, M.L.; RIERA-LIZARAZU, O.; HASH, C.T. Pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] consensus linkage map constructed using four RIL mapping populations and newly developed EST SSRs. *BMC Genomics*, v. 14, p. 159, 2013.

RAMOS, L.P.; DA SILVA, L.; BALLEM, A.C.; PITARELO, A.P.; CHIARELLO, L.M.; SILVEIRA, M.H.L. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. *Bioresource Technology*, v. 175, p. 195–202, 2015.

REIS, G.B. Mecanismos da eliminação cromossômica em híbridos de *Pennisetum purpureum* e *P. glaucum* e relações genômicas em *Pennisetum* spp. 2016. 96p. Tese Acadêmica (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RENGSIRIKUL, K.; ISHII, Y.; KANGVANSACHOL, K.; SRIPICHITT, P.; PUNSUVON, V.; VAITHANOMSAT, P.; NAKAMANEE, G.; TUDSRI, S. Biomass Yield, Chemical Composition and Potential Ethanol Yields of 8 Cultivars of Napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach.) Harvest 3-Monthly in Central Thailand. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, v. 3, n. 2, p. 107-112, 2013.

RITLAND, K. E JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity*, v. 47, n. 1, p. 35-52, 1981.

RITLAND, K. Estimation of gene frequency and heterozygosity from pooled samples. *Molecular Ecology Notes*, v. 2, p. 370-372, 2002.

RITLAND, K. Multilocus Mating System program MLTR. Version 3.1. British Columbia, Vancouver, 2004.

ROCHA, J.R.A.S.C.; MACHADO, J.C.; CARNEIRO, P.C.S.; CARNEIRO, J.C.; RESENDE, M.D.V.; LÉDO, F.J.S.; CARNEIRO, J.E.S. Bioenergetic potential and genetic diversity of elephantgrass via morpho-agronomic and biomass quality traits. *Industrial Crops and Products*, v. 95, p. 485-492, 2017.

ROHLF, F.J. NTSYS-pc: Numerical taxonomy system. Ver. 2.1. Exeter Software, Setauket, NY, p. 29–34, 2000.

SALEMI, L.F. Biocombustíveis de segunda geração: o futuro passa por aqui. Revista Brasileira de Bioenergia, v. 3, n. 7, p. 1-1, 2009.

SENTHILVEL, S.; JAYASHREE, B.; MAHALAKSHMI, V.; SATHISH KUMAR, P.; NAKKA, S.; NEPOLEAN, T.; HASH, C.T. Development and mapping of simple sequence repeat markers for pearl millet from data mining of expressed sequence tags. BMC Plant Biology, v. 8, p. 119, 2008.

SHAW, D.V.; ALLARD, R.W. Analysis of mating system parameters and population structure in Douglas fir using single and multilocus methods. In: CONKLE, M.T. (Ed.) Isozymes of Forest Trees and Forest Insects. Berkeley: University California Press, 1979. p.18-22.

SILVA, V.Q.R. Dialelo parcial em capim-elefante: capacidade combinatória em caracteres morfoagronômicos e bromatológicos em Campos dos Goytacazes, RJ. 2011.110 p. Tese Acadêmica - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

SINCLAIR, E.A.; GECAN, I.; KRAUSS, S.L.; KENDRICK, G.A. Against the odds: complete outcrossing in a monoecious clonal seagrass *Posidonia australis* (Posidoniaceae). Annals of Botany, v. 113, p. 1185-1196, 2014.

SOUZA, L.M.; GAZAFFI, R.; MANTELLO, C.C.; SILVA, C.C.; GARCIA, D.; LE GUEN, V.; CARDOSO, S.E.A.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. QTL Mapping of growth-related traits in a full-sib Family of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) evaluated in a sub-tropical climate. PLoS One, v. 8, e61238, 2013.

SOUZA SOBRINHO, F.; PEREIRA, A.V.; LEDO, F.J.S.; BOTREL, M.A.; OLIVEIRA J.S.; XAVIER, D.F. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milho. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 40, n. 9, p. 873-880, 2005.

SOUZA SOBRINHO, F.; LÉDO, F.J.S.; PEREIRA, A.V.; SILVA E OLIVEIRA, J. Avaliação do potencial de propagação por sementes de capim-elefante hexaploide. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 32, n. 3., p., 974-977, 2008.

SOUSA, A.C.B.; CARVALHO, M.A.; CAMPOS, T.; SFORÇA, D.A.; ZUCCHI, M.I.; JANK, L.; SOUZA, A.P. Molecular diversity, genetic structure and mating system of *Calopogonium mucunoides* Desv. Genetic Resources and Crop Evolution, v. 59, p. 1449-1464, 2012.

STAPT, O.; HUBBARD, C.E. Pennisetum. In: PRAIN, D. (Ed.). Flora of tropical Africa. Ashford: Reeve, 1934. v. 9, p. 954-1070.

SUNDARAM, G.R.; BABU, C.; SUNDARAMOORTHY, J.; VIJAYAKUMAR, G. Analysis of genetic diversity in napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) as detected by RAPD and ISSR markers. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, v. 18, p. 181–187, 2009.

SYAMALADEVI, D.P.; MEENA, S.S. E NAGAR, R.P. Molecular understandings on 'the never thirsty' and apomictic *Cenchrus* grass. Biotechnology Letters, v. 38, n. 3, p. 369-376, 2015.

TAYLOR, S.H.; HULME, S.P.; REES, M.; RIPLEY, B.S.; WOODWARD, F.I.; OSBORNE, C.P. Ecophysiological traits in C3 and C4 grasses: a phylogenetically controlled screening experiment. New Phytologist, v. 185, n. 3, p. 780–791, 2010.

THOMPSON, S.L.; RITLAND, K. A novel mating system analysis for modes of self-oriented mating applied to diploid and polyploidy arctic Easter daisies (*Townsendia hookeri*). Heredity, v. 97, p. 119-126, 2006.

VARASSIN, I.G.; TRIGO, J.R. E SAZIMA, M. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in southeastern Brazil. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 136, p. 139—152, 2001.

VELDKAMP, J.F. A revision of *Cenchrus* incl. *Pennisetum* (Gramineae) in Malesia with some general nomenclatural notes. Blumea, v. 59, p. 59-75, 2014.

VENCOVSKY, R.; PEREIRA, M. B.; CRISÓSTOMO, J. R.; FERREIRA, M. A. J. Genética e melhoramento de populações mistas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. Recursos genéticos e melhoramento: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 231-281.

VERLOOVE, F. New combinations in *Cenchrus* (Paniceae, Poaceae) in Europe and the Mediterranean area. Willdenowia, v. 42, p. 77-78, 2012.

VIEIRA, M.L.C.; SANTINI, L.; DINIZ, A.L.; MUNHOZ, C.F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. Genetics and Molecular Biology, v. 39, n. 3, p. 312-328, 2016.

WANG, D.; POSSW, J.A.; DONOVAN, T.J.; SHANNON, M.C.; LESCH, S.M. Biophysical properties and biomass production of elephant grass under saline conditions. Journal of Arid Environments, v. 52, p. 447–456, 2002.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. The grass genera of the world. CAB International, University Press, Cambridge, 1992.

WEBSTER, R.D. Genera of the North American Paniceae (Poaceae: Panicoideae). *Systematic Botany*, v. 13, p. 576–609, 1988.

WISELOGEL, A.; TYSON, J. E JOHNSON, D. Biomass feedstock resources and composition. In: WYMAN, C.E. Handbook on bioethanol: production and utilization. Washington, DC: Taylor and Francis, 1996. p. 105–118.

XIE, X.M.; ZHOU, F.; XIANG-QIANZHANG; JU-MINGZHANG. Genetic variability and relationship between MT-1 elephant grass and closely related cultivars assessed by SRAP markers. *Journal of Genetics*, v. 88, n. 3, p. 281-290, 2009.

XU, J.; LIU, L. XU, Y.; CHEN, C.; RONG, T.; ALI, F.; ZHOU, S.; WU, F.; LIU, Y.; WANG, J. *et al.* Development and characterization of simple sequence repeat markers providing genome-wide coverage and high resolution in maize. *DNA Research*, v. 20, p. 497-509, 2013.

YADAV, O.P.; MITCHELL, S.E.; ZAMORA, A.; FULTON, T.M. KRESOVICH, S. Development of new simple sequence repeat (SSR) markers for pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. *Journal of the SAT Agricultural Research*, v. 3, n. 1, 2007.

YASUDA, M.; ISHII, V.; OHTA, K. Napier Grass (*Pennisetum purpureum* Schumach) as Raw Material for Bioethanol Production: Pretreatment, Saccharification, and Fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 19, p. 943-950, 2014.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J. E OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 17-34, 2001.

ZENG-HUI, L.; HONG-BO, S. Main developments and trends of international energy plants, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 530-534, 2010.

ZHANG, L.; YUAN, D.; YU, S.; LI, Z.; CAO, Y.; MIAO, Z.; QIAN, H.; TANG, K. Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*, v. 20, p. 1081-1086, 2004.

ZHOU, F.; DONG, Z.X.; XIE, X.M. Review on the research and utilization of *Pennisetum purpureum* cv. Mott in tropical and subtropical areas. *Grassland and Turf*, v. 3, p. 76–82, 2007.