

A ESPECTROSCOPIA DE REFLETÂNCIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E A INTERAÇÃO GENÓTIPO X AMBIENTE

Viviane Magrini¹, Mariana Dias², Ana Claudia da S. Costa³, Gilberto B. Souza⁴, Frederico P. Matta⁵, Bianca B. Z. Vigna⁶ e Alessandra P. Fávero⁷

^{1,2} Universidade Federal de São Carlos/Departamento de Química, CP 676, CEP 13560-970. São Carlos-SP, Brasil; viviane.magrini@ig.com.br

³ Técnico em Agropecuária CPEA. São Carlos (SP)

^{4,5,6,7} Embrapa Pecuária Sudeste, C.P. 339, 13560-970. São Carlos SP, Brasil.

Resumo- Foi avaliado o potencial da técnica de espectroscopia de refletância no infravermelho próximo (NIRS) em caracterizar diferentes genótipos de gramíneas em duas épocas do ano. O estudo foi realizado na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos-SP), considerando amostras de 25 diferentes acessos, entre 15 espécies, do gênero *Paspalum* e de duas testemunhas, a *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e a *Panicum maximum* cv. Tanzânia. As análises foram realizadas com os dados obtidos nos meses correspondentes ao solstício de primavera/verão (dezembro/2012) e de outono/inverno (junho/2013). Os resultados demonstraram que a técnica NIRS possui alta sensibilidade em detectar a interação genótipo por ambiente, fato corroborado pelos resultados obtidos pelas ANOVAs das variáveis obtidas a campo. Os agrupamentos obtidos com os dados NIRS possuem alguma semelhança com os obtidos com os dados de campo. Após o desenvolvimento de modelos de calibração em NIRS para a determinação de parâmetros químico-bromatológicos, espera-se que essa técnica possa colaborar com mais eficiência nos programas de melhoramento genético vegetal.

Palavras-chave: *Paspalum*, forrageiras, interação genótipo por ambiente, infra vermelho próximo, NIRS.

Área do Conhecimento: Melhoramento genético vegetal

Introdução

O Brasil se destaca como exportador de carne bovina produzida com base em pastagens, um alimento de grande disponibilidade e de baixo custo. Entretanto, existem diversos fatores limitantes em relação à produção pecuária dentro do continente sul-americano, entre eles a falta de alimentação apropriada para o gado. Além disso, devido aos ecotipos apomíticos, existem cultivos de grandes extensões em monoculturas, deixando o ecossistema vulnerável às pragas e doenças (ARAÚJO, 2008). Assim, com o passar dos anos, houve um aumento no interesse nas pesquisas sobre plantas forrageiras, como também sua importância em relação à seleção de novas cultivares, no continente sul-americano (BATISTA & GODOY, 2000).

O gênero *Paspalum* pertence à família das gramíneas (*Poaceae*), possui cerca de 330 espécies distribuídas em 20 grupos taxonômicos (ZULOAGA & MORRONE, 2005). Este gênero é considerado destaque dentro desta família, pois exibe um grande acervo de espécies nativas com considerável valor forrageiro e alta capacidade de adaptação de algumas espécies em relação à determinadas condições, como por exemplo:

acidez, desfolha, fogo, frio e alagamento (MEIRELLES *et al*, 2006).

Há diversos procedimentos analíticos para determinar a qualidade nutricional, assim como o potencial forrageiro. Entre estes, a técnica de espectroscopia de refletância no infravermelho próximo (NIRS) vem sendo utilizada com grande frequência. Esta técnica tem como princípio básico a absorção da luz na região do infravermelho próximo (780 a 2500 nm) por compostos orgânicos (proteínas, aminoácidos, lipídeos e carboidratos) e se baseia no fato de que cada um dos principais constituintes apresenta características específicas de absorção. A radiação infravermelha refletida pelo equipamento é transformada em energia elétrica, a qual é transferida ao computador para a formação dos espectros, devido ao fato de que os componentes orgânicos dos materiais vegetais absorvem e refletem a luz de forma diferente (FREITAS, 2010). Este procedimento é caracterizado como preciso, não destrutivo, de baixo custo e com possibilidade de análises simultâneas de vários analitos (PASQUINI, 2003).

Os objetivos desse trabalho são caracterizar as diferentes espécies de *Paspalum* em dois diferentes períodos (solstício primavera/verão e outono/ inverno) utilizando a técnica NIRS e

avaliar seu potencial para detecção da interação genótipo por ambiente.

Metodologia

Os estudos foram realizados na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos-SP), com base em amostras coletadas em épocas contrastantes, sendo o mês de dezembro de 2012 (solstício primavera/verão) e de junho de 2013 (solstício outono/inverno). Para essas análises foram utilizados três acessos de *P. notatum*, dois acessos de *P. regnellii*, dois de *P. atratum*, um de *P. brunneum*, um de *P. conspersum*, dois de *P. dilatatum*, um de *P. juergensii*, um de *P. lenticulare*, três de *P. limbatum*, dois de *P. malacophyllum*, um de *P. mandiocanum*, um de *P. plicatulum* e cinco acessos (*P. sp.*), os quais não possuem identificação botânica *a priori*; como também as testemunhas *Urochloa brizantha* cv. Marandu e *Megathyrsus maximum* cv. Tanzânia.

O experimento a campo foi instalado em parcelas de 3x2 m, com quatro repetições. Amostras foram obtidas no interior dessas parcelas, considerando uma área útil de dois m². Foram obtidas as seguintes informações agrônomicas: altura média das plantas na parcela (*ALT*; cm); produção de matéria verde total (*PMVT*; g); porcentagem de folha na amostra (*%PF*); porcentagem de hastes na amostra (*%PH*) e porcentagem de material morto (*%MM*). Posteriormente, as amostras foram secas em estufa sob 60 °C durante 72 horas, sendo coletadas as seguintes variáveis: peso de matéria seca das folhas na parcela (*PFS*; g); peso de matéria seca das hastes na parcela (*PHS*; g) e peso de matéria seca do material morto na parcela (*PMMS*; g). Após a secagem, as amostras totais (sem divisão de folha, haste e material morto) foram moídas em um moinho de facas tipo Willey com peneira de 1 mm de diâmetro. As amostras foram conduzidas ao Laboratório de Nutrição Animal, para a coleta dos espectros, em triplicata, em espectrômetro de infravermelho próximo com transformada de Fourier, NIRFlex N-500 Solids (BÜCHI).

Os espectros, formados por 1500 pontos de observação, foram analisados por meio da Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA). Para tanto, foi realizado o cálculo da média das leituras em triplicatas para cada amostra, assim como das repetições obtidas a campo. Por fim, os dados foram analisados com o auxílio do Software de Quimiometria Pirouette® 4.0.

Considerando as variáveis fenotípicas obtidas a campo, inicialmente foram realizadas análises de variância visando determinar a existência de variabilidade significativa nas respostas dos materiais avaliados. Para as demais análises multivariadas, somente foram utilizadas as variáveis que demonstraram resultados significativos. Da mesma forma, com base nestes dados foram realizadas análises de interação genótipo por ambiente.

Nas análises multivariadas, visando verificar a existência de uma relação entre o comportamento dos compostos orgânicos apresentado pelas diferentes espécies, inicialmente foi realizada uma análise de agrupamento hierárquico por meio do método aglomerativo de Ward, tendo como medida de dissimilaridade a distância euclidiana. Para equalizar a importância estatística de todas as variáveis utilizadas, foi realizado um pré-tratamento por meio da transformação Z, de tal modo que o conjunto de dados apresentasse média zero e variância igual a um. Utilizou-se a ANOVA para avaliar a significância das variáveis em cada grupo e a análise multivariada da variância (MANOVA), através do teste T2 de Hotelling, para avaliar a diferença entre grupos ($P < 0,01$). Após esses passos foi utilizada a técnica de Análise de Componentes Principais (PCA) para examinar a relação conjunta do grupo de variáveis em dimensão reduzida, adotando o critério de Kaiser e avaliada a contribuição das variáveis mais importantes para a construção das duas primeiras componentes principais. Além de efetuar o arranjo dos materiais genéticos, o método k-médias foi utilizado na divisão de grupos, de tal modo que a semelhança dentro de grupos e as diferenças entre grupos fossem máximas (Val et al., 2008). Todas as análises realizadas, com os dados obtidos a campo, foram realizadas com o auxílio do pacote computacional Statistica (STATSOFT, 2004).

Resultados

As análises de variância (Tabela 1) demonstram a existência da interação genótipo por ambiente para a maioria das variáveis mensuradas a campo. As Análises de Componentes Principais (PCA), realizadas com os dados obtidos a campo (Figuras 1 e 2) e as Análises de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), realizadas com os dados obtidos com o auxílio do NIRS (Figuras 3 e 4) também demonstram esse tipo de resultado.

Tabela 1. Resumo das análises de variância considerando as duas épocas de avaliação.

Fonte de variação	GL	ALT	PMVT	PFS	PHS	PMMS	%PF	%PH	%MM
Blocos	3	**	ns	ns	ns	*	ns	ns	*
Genótipos (G)	26	**	**	**	**	ns	ns	**	**
Época (E)	1	**	**	**	**	**	ns	**	**
Interação G x E	23	**	**	**	**	ns	ns	**	**
R ²		0,97	0,89	0,78	0,81	0,48	0,31	0,87	0,75
C.V.(%)		12,26	42,89	32,4	72,05	99,87	88,25	43,42	70,39

Legenda: ALT= altura média das plantas na parcela; PMVT= produção de matéria verde total; PFS= peso de matéria seca das folhas na parcela; PHS= peso de matéria seca das hastes na parcela; PMMS= peso de matéria seca do material morto na parcela; %PF= porcentagem de folha na amostra; %PH= porcentagem de hastes na amostra; %MM= porcentagem de matéria morta; ns=não significativo estatisticamente a 5%; * e **= significativo estatisticamente a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

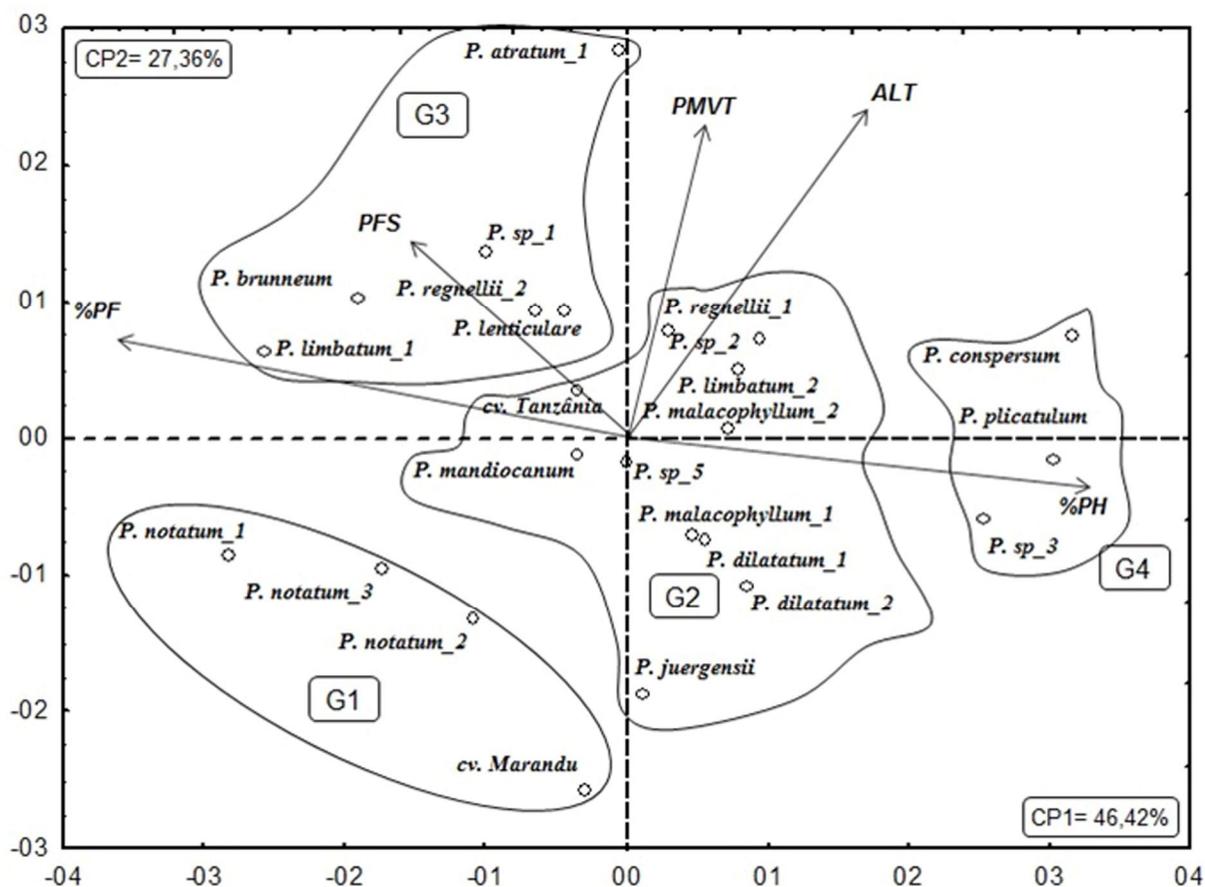


FIGURA 1: Análise dos Principais Componentes (PCA) referente ao mês de Dezembro/2012.

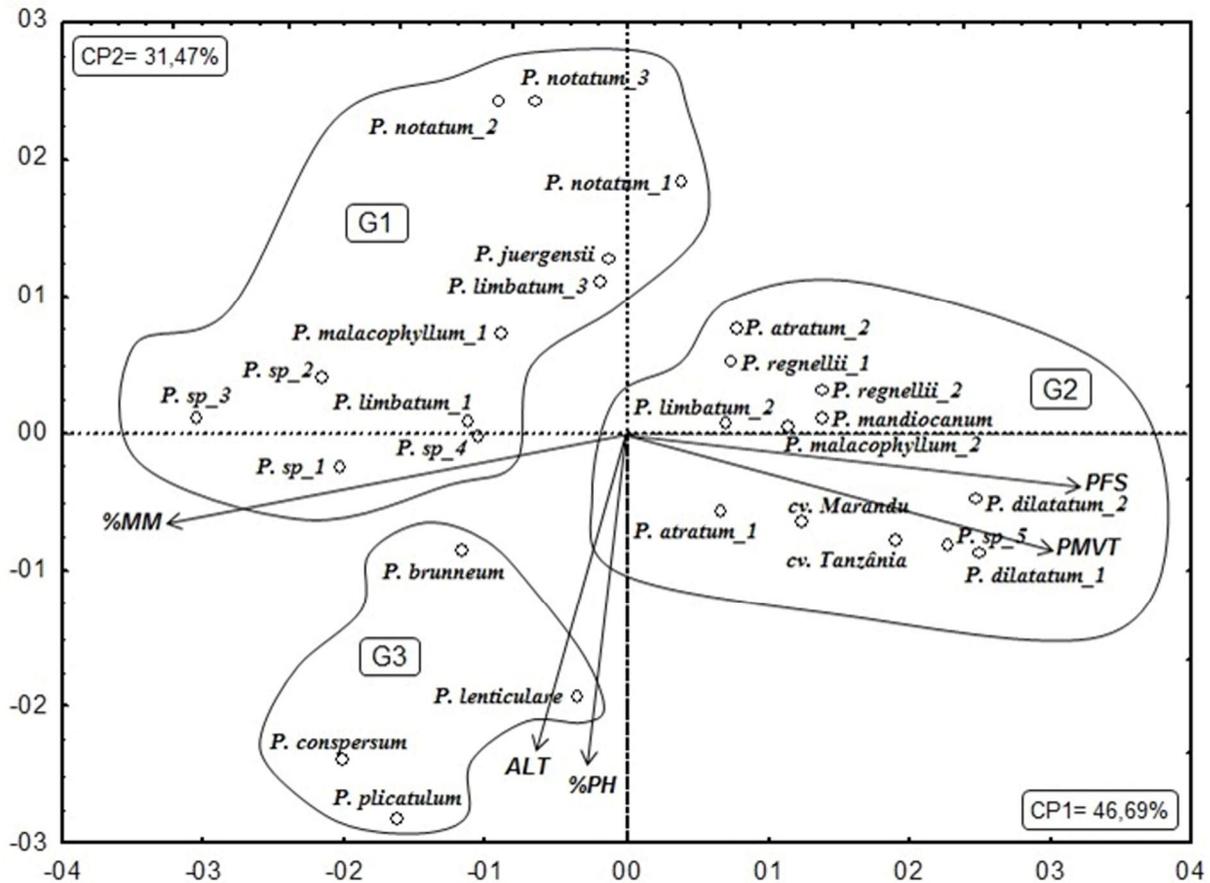


FIGURA 2: Análise dos Principais Componentes (PCA) referente ao mês de Junho/2013.

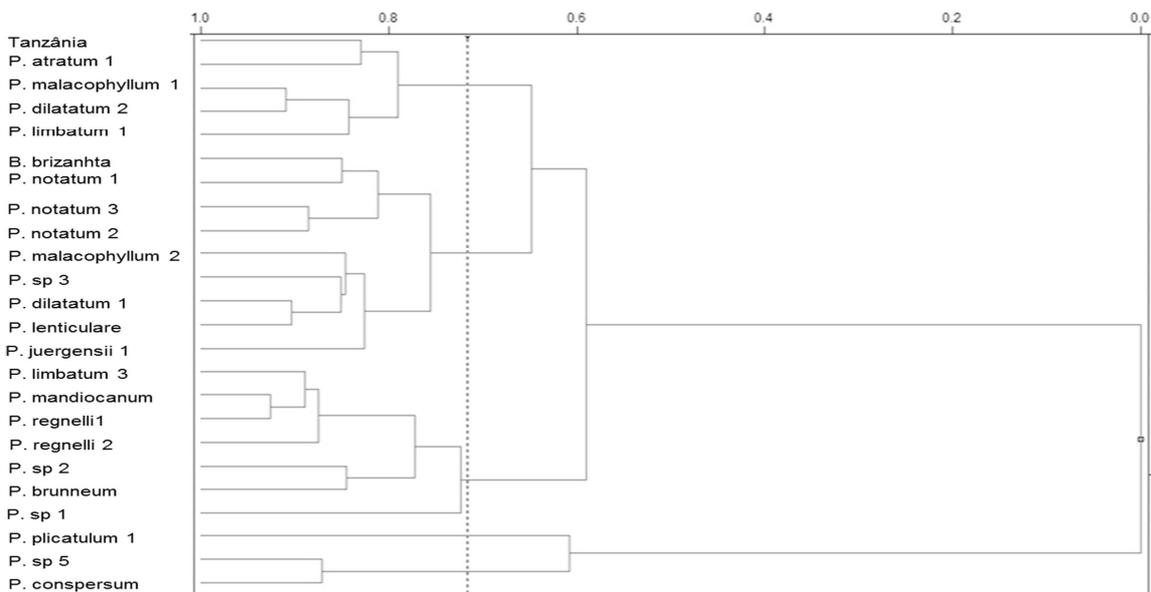


FIGURA 3: Dendrograma construído com os dados espectrais obtidos com o NIRS, referente ao mês de Dezembro/2012.

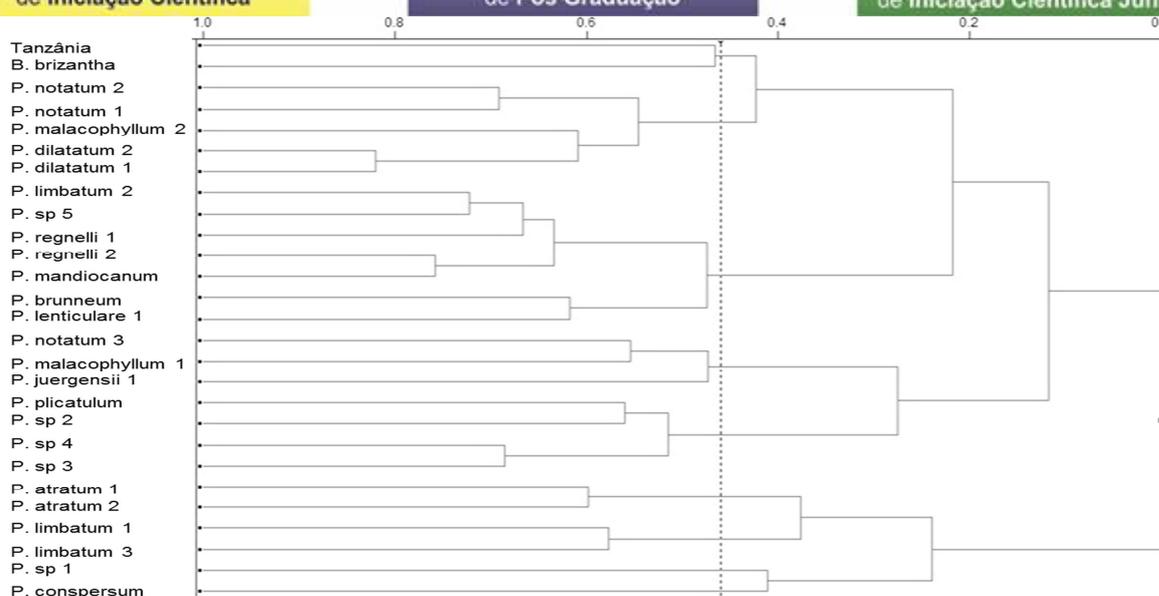


FIGURA 4: Dendrograma construído com os dados espectrais obtidos com o NIRS, referente ao mês de Junho/2013.

Discussão

A interação genótipo por ambiente, detectada a partir de análises convencionais de variância, serviu como um padrão a ser observado nas análises realizadas com os dados obtidos com o NIRS. Essa interação significa que o comportamento relativo entre materiais genéticos em um dado ambiente é diferente estatisticamente dos resultados apresentados em outro ambiente. Dessa forma, como um exemplo, um genótipo selecionado em um dado ambiente por qualquer motivo, pode não se destacar em outro ambiente, sendo, portanto, alvo de descarte neste ambiente, em um programa de melhoramento.

A Tabela 1 indica a presença de interação significativa para a maioria das características mensuradas a campo. Dessa forma, é natural que as análises multivariadas apresentem resultados gráficos distintos, considerando estas duas épocas de avaliação.

Com base nas análises de PCA para o mês de Dezembro/2012 (Figura 1) houve a formação de quatro grupos distintos estatisticamente, com as primeiras duas componentes principais explicando 73,78% da variação fenotípica total. As variáveis *PHS*, *PMMS* e *%MM* não tiveram participação significativa na formação dos grupos sendo, portanto, descartadas destas análises. Para o mês de Junho/2013 (Figura 2) houve a formação de três grupos distintos estatisticamente, com as primeiras duas componentes principais explicando 78,16% da variação fenotípica total. Neste caso, as

variáveis *%PF*, *PMMS* e *PHS* não tiveram participação significativa na formação dos grupos sendo, portanto, descartadas destas análises.

As setas apresentadas nos gráficos de componentes principais representam os vetores das variáveis utilizadas. Os materiais que se destacaram quanto a uma determinada variável, tendem a se localizar no sentido da seta. Como ilustração, verifica-se que no mês de dezembro (Figura 1), os materiais *P. notatum1*, *P. notatum2*, *P. notatum3* e a cv. Marandu formaram o Grupo 1. Esse grupo foi formado por materiais que apresentaram valores mais baixos de altura de plantas e de produção de matéria verde total (sentido contrário à seta).

Como esperado, as análises de HCA realizadas com os dados NIRS apresentam resultados diferentes considerando as duas épocas de avaliação (Figuras 3 e 4, respectivamente).

Ao analisar mais detalhadamente essas figuras é possível verificar certa semelhança entre os resultados obtidos com os espectros das análises com o NIRS e os resultados obtidos com os dados de campo.

Para o NIRS, as amostras devem apresentar o mesmo perfil de tamanho de partículas, assim as diferenças morfológicas existentes a campo, literalmente viram pó, não podendo mais servir como parâmetro visual para diferenciação dos materiais. Contudo, a quantidade de espécies químicas presentes nas amostras é preservada e este conteúdo químico está fortemente correlacionado com a variação ambiental.

Existem diversos fatores que podem influenciar a composição bromatológica de um material vegetal, entre eles: a espécie, a cultivar, o estágio de desenvolvimento, o nível de adubação, a estrutura celular e dos tecidos, a relação folha/colmo, a senescência foliar, entre outros (Costa et al., 2009). Por exemplo, espécies com alta porcentagem de hastes devem apresentar a tendência em ter altos teores de lignina e, assim, baixa digestibilidade.

Vale relatar que as relações observadas entre os materiais vegetais, independente da época de avaliação, diferiram das relações detectadas por Cidade et al. (2013), em análises com base em marcadores moleculares do tipo microssatélites. No presente trabalho, as relações observadas referem-se a dados fenotípicos, os quais apresentam grande efeito ambiental, principalmente nas características quantitativas, como a maioria avaliada neste trabalho.

Destaca-se a importância de desenvolver modelos de calibração com os espectros de NIR para os parâmetros químico-bromatológicos: lignina, fibra bruta, proteína, matéria seca, matéria mineral, FDA (Fibra em Detergente Ácido), FDN (Fibra em Detergente Neutro), DIVMS (Digestibilidade in vitro de Matéria Seca). Por meio desses modelos será possível prever a composição química das amostras estudadas e avaliar a qualidade nutricional de espécies, do gênero *Paspalum* com base em valores quantitativos.

Conclusão

A técnica NIRS é uma poderosa ferramenta a ser utilizada em programas de melhoramento de espécies vegetais e com esta é possível diferenciar os acessos como, também, detectar a interação genótipo por ambiente.

Agradecimentos

À Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária); à Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo nº2011/20558-0) e ao Convênio Embrapa/Unipasto (Associação para o fomento à pesquisa de melhoramento de forrageiras) pelo apoio financeiro concedido.

Referências

- ARAÚJO, S.A.C.; B.B. DEMINICIS; P.R.S.S. CAMPOS. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil, **Arch. Zootec.** 57 (R): 61-76. 2008.

- BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Caracterização Preliminar e Seleção de Germoplasma do Gênero *Paspalum* para Produção de Forragem. **Rev. bras. zootec.**, 29(1): 23-32, 2000.

- CIDADE, W.F.; VIGNA, B.B.Z.; SOUZA, F.H.D.; VALLS, J.F.M.; DALL'AGNOL, M.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA-CHIES, T.T.; SOUZA, A.P. Genetic variation in polyploid forage grass: assessing the molecular genetic variability in the *Paspalum* genus. **BMC Genetics** 2013. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/14/50>. Acesso em 11/09/2013.

- COSTA, N. L.; GIANLUPPI, V.; BENDAHAN, A. B. Composição Química de Pastagens Nativas. *Boletim Pecuário . Artigos Técnicos*. Disponível em: <http://www.boletimpecuario.com.br/artigos/showartigo.php?arquivo=artigo1792.txt&tudo=sim>. Acesso em 28/08/2013.

- FREITAS, J.C. Composição bromatológica da gramínea nativa (*Mesosetum chaseae*) e exótica (*Brachiaria humidicola*) no Pantanal utilizando métodos convencionais de espectroscopia de refletância no infravermelho próximo. Dissertação (Mestrado) . Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia . FAMEZ da Universidade do Mato Grosso do Sul, 2010.

- MEIRELLES, P. R. L.; BATISTA, L. A. R.; COSTA, C. Avaliação de germoplasma do gênero *Paspalum* com potencial para produção de forragem. **ZOOTEC - Centro de Convenções de Pernambuco**, 2006.

- PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications, **J. Braz. Chem. Soc.**, 14, 198-219, 2003.

- ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. Revisión de las especies de *Paspalum* para America del Sur Austral, 1 ed. St Louis, USA: Missouri Botanical Garden Press., 2005. 297 p.

- STATSOFT, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. Disponível em: www.statsoft.com. Acesso em 11/09/2013

- VAL, J.E.; FERRAUDO, A.S.; BEZERRA, F.; CORRADO, M.P.; LÔBO, R.B.; FREITAS, M.A.R.; PANETO, J.C.C. Alternativas para seleção de touros da raça Nelore considerando características múltiplas de importância econômica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.705-712, 2008.