

**Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRO-CENTRO-OESTE Nº 031/2010**

**Anexo I – Modelo Estruturado de Projeto**

Seleção pública de propostas para concessão de apoio financeiro a projetos de pesquisa científica e tecnológica que visem à implantação e consolidação da Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação – Rede PRO-CENTRO-OESTE.

Edital:	<b>Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRO-CENTRO-OESTE Nº 031/2010</b>
Coordenador/Proponente:	Cacilda Borges do Valle
Título da Proposta:	Melhoramento genético de <i>Brachiaria</i> e avaliação de fluxo gênico em <i>B. brizantha</i> .
Tipo de Proposta (Projeto de Pesquisa/Projeto de Rede):	Projeto de Rede
Nome da Rede de Pesquisa:	Desenvolvimento de cultivares de forrageiras nativas e exóticas: mudanças climáticas e produção sustentável de proteína animal
Linhas de Pesquisa e Temas:	<p><b>Linha 1 – Ciência, Tecnologia e Inovação para Sustentabilidade da Região Centro-Oeste</b>  Tema 1 – Plantas de relevância regional e resistência a estresses bióticos (pragas, ervas daninhas, fungos, bactérias, vírus e nematódeos) e abióticos (alterações climáticas, limitações edáficas, entre outros).  Tema 2 – Conhecimento e tecnologias para o planejamento de sistemas produtivos e ambientalmente sustentáveis</p> <p><b>Linha 3 – Desenvolvimento de Produtos, Processos e Serviços Biotecnológicos</b>  Tema 2 – Pesquisa, desenvolvimento e inovação nas áreas de fronteira de nanotecnologia, genômica, pós-genômica, proteômica e bioinformática.</p>
Instituição Executora:	Embrapa Gado de Corte
Unidade da Federação:	Mato Grosso do Sul
Instituições Colaboradoras:	Embrapa (Embrapa Gado de Corte, Embrapa Cerrados, Embrapa Acre, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), Universidade Católica Dom Bosco, Universidade Federal da Grande Dourados, Universidade Estadual de Maringá
Valor Total Solicitado pelo Projeto de Pesquisa (R\$):	R\$ 856.767,20
Prazo de Execução:	36 meses

**Título do Projeto de Pesquisa:** Melhoramento genético de *Brachiaria* e avaliação de fluxo gênico em *B. brizantha*.

### **1. identificação da proposta, da localidade escolhida e do tipo de projeto**

Projeto de pesquisa componente da Rede: **Desenvolvimento de cultivares de forrageiras nativas e exóticas: mudanças climáticas e produção sustentável de proteína animal**, a ser liderado pela Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS) e executado no Mato Grosso do Sul e Paraná.

### **2. Identificação da Linha de Pesquisa e Tema da proposta**

A proposta abordará os temas1 (Plantas de relevância regional e resistência a estresses bióticos (pragas, ervas daninhas, fungos, bactérias, vírus e nematódeos) e abióticos (alterações climáticas, limitações edáficas, entre outros) e 2: – Conhecimento e tecnologias para o planejamento de sistemas produtivos e ambientalmente sustentáveis da **Linha 1 – Ciência, Tecnologia e Inovação para Sustentabilidade da Região Centro-Oeste**, bem como o Tema 2 – Pesquisa, desenvolvimento e inovação nas áreas de fronteira de nanotecnologia, genômica, pós-genômica, proteômica e bioinformática da **Linha 3 – Desenvolvimento de Produtos, Processos e Serviços Biotecnológicos**. Por envolver trabalhos com espécies de *Brachiaria*, a gramínea de grande relevância para pecuária nacional e especialmente para o Brasil Central Pecuário, o projeto tem especial aderência à Linha 1 mas pretende avançar nos conhecimentos sobre o fluxo gênico preparando-nos para trabalhos com plantas transformadas para menor deposição de lignina usando genômica, portanto abordando também o tema 2 da Linha 3. Essas plantas serão resultado de um projeto internacional em colaboração com a Austrália (Victorian AgriBiosciences Centre – VABC/DPI Victoria).

### **3. Identificação dos Programas de Pós-Graduação envolvidos na proposta, bem como dos mecanismos de integração propostos no âmbito do projeto de Rede**

Os Programas de Pós-Graduação envolvidos serão os de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco; Mestrado e Doutorado em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá; Mestrado e Doutorado em Agronomia-Produção Vegetal da Universidade Federal da Grande Dourados, e o de mestrado em Zootecnia da UNESP-Botucatu.

As atividades previstas neste projeto serão realizadas no Centro-Oeste e permitirão incorporar alunos das referidas universidades nos trabalhos de melhoramento de *Brachiaria* em andamento na Embrapa bem como permitirão um maior entrosamento com o corpo docente e pesquisadores das referidas instituições. Dois alunos de mestrado (UCDB e UNESP-Botucatu) já iniciaram seus estudos com planos de trabalhos integrados a esse projeto, respectivamente com fluxo gênico em *B. brizantha*, e avaliação de progênies de *B. decumbens*. Já existe uma estreita colaboração de mais de 10 anos entre a Embrapa Gado de Corte com a Universidade Estadual de Maringá, que resultou em extensa publicação de importantes resultados para o melhoramento e seleção de genótipos candidatos a cultivares.

A criação dessa rede permitirá tornar mais efetiva a colaboração entre as diferentes instituições e reuniões periódicas facilitarão a troca de experiências, informações e verificação do andamento dos trabalhos visando o atingimento das metas.

### **4. Principal problema a ser abordado**

Gramíneas forrageiras introduzidas especialmente as do gênero *Brachiaria*, contribuíram decisivamente para o desenvolvimento da bovinocultura nacional fazendo do Brasil o segundo maior produtor e maior exportador mundial de carne (ABIEC, 2010). O diferencial qualitativo do produto brasileiro é o chamado “boi de capim”, i.e., animais produzidos em pastagens, portanto sem riscos associados à BSE (Encefalopatia Espongiforme Bovina) e observando o bem estar animal. Paralelamente, o Brasil é o maior produtor e exportador de sementes forrageiras tropicais da América Latina e sementes de cultivares de *Brachiaria* respondem por 90% de toda sementes forrageira exportada. As demandas por qualidade e quantidade de sementes vêm impulsionando toda a cadeia produtiva que é fortemente concentrada no Centro-Oeste, pela aptidão edáfica e climática para produção de sementes forrageiras tropicais. Houve inclusive o estímulo para promover a organização do setor privado sementeiro em associações como a UNIPASTO (Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais), parceira da Embrapa nos projetos de desenvolvimento de cultivares de gramíneas e leguminosas forrageiras. Essa associação, além de aportar recursos anualmente para pesquisa em centros da Embrapa atua como agente de transferência das cultivares geradas por comercializá-las com exclusividade entregando um pacote tecnológico com as recomendações de uso.

Cultivares de *Brachiaria* representam cerca de 80% do que está plantado como pastagem cultivada no Brasil (SANTOS FILHO, 1996), área essa estimada em 100 milhões de hectares. A exploração pecuária na região dos cerrados, um bioma de cerca de 220 milhões de hectares e que cobre 24% do Brasil (IBGE, 2004), emprega principalmente pastagens de *B. brizantha* cv. Marandu, *B. decumbens* cv. Basilisk, e *B. humidicola* comercial (MACEDO, 1995). Em regiões úmidas do Nordeste e da Amazônia a pecuária tem utilizado principalmente pastagens de *B. humidicola*, seguidas da *B. decumbens* e *B. brizantha* cv. Marandu (SIMÃO NETO & DIAS FILHO, 1995, DIAS-FILHO, 2005). Capins do gênero *Brachiaria* desempenham um papel primordial na produção de carne e leite no Brasil por viabilizarem a pecuária em solos ácidos e fracos, por participarem na importante rotação com culturas anuais em sistemas integrados lavoura-pecuária e por criarem novos pólos de desenvolvimento graças a uma pujante indústria de produção de sementes. Apesar disso poucas são as cultivares disponíveis (VALLE et al., 2001) e por serem apomíticas, a diversidade genética é pequena, colocando em risco todo o sistema de produção (PEREIRA et al., 2001; DIAS-FILHO, 2005). O principal problema a ser abordado por este projeto é, portanto, a redução da vulnerabilidade destes extensos monocultivos pela liberação de variedades de *Brachiaria* que apresentem boa produtividade e alto desempenho animal, minimizando a necessidade de abertura de novas áreas de cultivo.

Estudos realizados desde 1988 pela Embrapa Gado de Corte e parceiros (VALLE & SAVIDAN, 1996; VALLE & MILLES, 1992); VALÉRIO et al., 2001; DIAS-FILHO, 2002; MENDES-BONATO et al., 2002; RESENDE et al., 2002; PEREIRA et al., 2004; LEMPP et al., 2005; PAGLIARINI et al., 2005; PEREIRA et al., 2005; JUNGSMANN et al., 2009a, b; EUCLIDES et al., 2008, 2009; VALLE et al., 2008, 2009; 2010; BOLDRINI et al., 2009) sobre o germoplasma de *Brachiaria* trazido da África via CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical, constituem uma sólida base para o desenvolvimento de novas cultivares, superiores as cultivares hoje em uso. O melhoramento genético de gramíneas forrageiras tropicais é atividade recente, mas significativos progressos foram alcançados, inclusive com a liberação de cultivares, cv. Xaraés em 2003 (VALLE et al. 2004) e uma cultivar protegida, a BRS Piatã em 2007 (EUCLIDES et al., 2008, 2009). A primeira cultivar de *B. humidicola* protegida, cv. BRS Tupi será liberada em 2011, como importante alternativa às cv. Llanero e comum para áreas com drenagem deficiente em solos ácidos e

pobres. Informações básicas sobre a diversidade nas coleções de *B. brizantha* e *B. humidicola* foram estabelecidas usando-se marcadores moleculares RAPD (CHIARI et al., 2007, 2008) e microssatélites (JUNGMANN et al., 2009a, b). Nesta rede, híbridos promissores já entrarão em avaliação de valor de cultivo e uso sob cortes e também está prevista a instalação do primeiro ensaio sob pastejo. O programa de melhoramento genético em *Brachiaria* via hibridização, teve início em 1988 envolvendo principalmente *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*, as duas primeiras com uma maioria de acessos apomíticos e tetraplóides naturais e a última caracterizada por sexualidade no nível diplóide. Acessos de *B. ruziziensis* tetraploidizados artificialmente por colchicina formam a população básica para cruzamentos que visam reunir a alta produtividade de *B. brizantha* cv. Marandu, com a tolerância a solos ácidos e vigor da *B. decumbens* cv. Basilisk e o alto valor nutritivo, florescimento concentrado e rápida rebrota da *B. ruziziensis*. Neste projeto está prevista a avaliação agrônômica de progênies híbridas de *B. humidicola* (VALLE et al., 2008) e também de híbridos intra-específicos de *B. decumbens* recém obtidos por cruzamentos com acessos sexuais diplóides recém duplicados (SIMIONI & VALLE, 2009). Nunca antes foi possível realizar o melhoramento de *B. decumbens* que conta apenas com a cv. Basilisk em uso desde meados do século passado, sendo esta, portanto uma oportunidade inédita de explorar a variabilidade em *B. decumbens*.

O envolvimento de novas técnicas de biotecnologia de genômica deverão permitir avanços ainda mais rápidos na produção de novas variedades apomíticas, como o uso de marcadores para identificar híbridos (CHIARI et al., 2008) e para identificar a apomixia (ZORZATTO et al., 2010). Algumas das características de importância agrônômica como resistência a insetos, valor nutritivo, adaptação a solos ácidos e tolerância ao alumínio, já foram analisadas com auxílio de marcadores moleculares em outras culturas (revisado por KUMAR, 1999) e irão compor atividades em outros projetos da rede (Projetos 2 e 3), utilizando os genótipos selecionados nesse projeto 1 (Figura 1). Neste projeto a opção por análise de seqüências hipervariáveis de DNA, também conhecidas como seqüências microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), considerados os marcadores que mais se aproximam do ideal para estudos genéticos, deve-se às seguintes vantagens: 1) são abundantes e uniformemente distribuídos pelo genoma; 2) são co-dominantes; 3) são usualmente multialélicos, apresentando grande conteúdo informativo por loco gênico; 4) apresentam, geralmente, alto grau de heterozigozidade em espécies alógamas; e 5) são marcadores de baixo custo e fácil aplicação à análise de um grande número de plantas, quando a técnica está estabelecida para a espécie (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Esta técnica vem sendo utilizada com sucesso em diversas gramíneas como milho (SHAROPOVA et al., 2002; NINAMANGO-CÁRDENAS et al., 2003), cana de açúcar (CORDEIRO et al., 2000) e arroz (MCCOUCH et al., 1997; GARLAND et al., 1999) e mais recentemente com duas espécies de *Brachiaria* (JUNGMANN et al., 2009a, b). A disponibilidade de marcadores microssatélites irá possibilitar não apenas a identificação de forma rápida e segura da origem híbrida das progênies no estudo de fluxo gênico, mas também permitirá estimar a diversidade genética e modo de reprodução, e permitirá verificar a identidade das cultivares e híbridos, facilitando o acompanhamento da adoção das cultivares liberadas, assegurando a paternidade do material aos seus legítimos geradores. Há outro projeto em andamento na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em colaboração com esta equipe, que estuda os mecanismos de regulação temporal e espacial da apomixia em *Brachiaria* e que desenvolve processos de transformação de *Brachiaria* para que com a identificação de genes candidatos torne possível produzir transgênicos.

A citogenética do gênero *Brachiaria* ganhou novas dimensões com o trabalho realizado em parceria com a Universidade Estadual de Maringá. Pelos trabalhos que vem sendo conduzidos na última década foi possível descrever as inúmeras anormalidades

meióticas encontradas e possíveis mutações meióticas em acessos da coleção e híbridos do programa, gerando inúmeras publicações em periódicos internacionais e reunida em um capítulo de livro internacional (VALLE & PAGLIARINI, 2009), além de teses e dissertações. As informações geradas auxiliam na explicação do baixo potencial de produção de sementes em vários dos acessos e especialmente nos híbridos interespecíficos, demonstrando a importância dessa atividade no programa de melhoramento do gênero. Foi estabelecido um novo número básico de cromossomos para o gênero ( $x = 6$ ) descrito para *B. dictyoneura* (RISSO-PASCOTTO et al., 2006a,b) e também confirmado para *B. humidicola* (BOLDRINI et al., 2009).

A avaliação do valor nutritivo é um parâmetro crucial na seleção de genótipos promissores para utilização por bovinos, porém, análises completas da composição química, digestibilidade, consumo e taxa de passagem são inexecutáveis e onerosas em trabalhos com número elevado de acessos ou híbridos. Por isso técnicas e equipamentos, como as sugeridas por HERRERO & JESSOP (1996) ou HERRERO et al., (1996) podem ser utilizadas visando simplificar as avaliações de numerosos genótipos em programas de melhoramento. Algumas como resistência ao cisalhamento WILSON (1965) foram testadas em *Brachiaria* com resultados promissores (HUGHES et al., 2000; HERRERO et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2010). Da boa correlação destas técnicas com a composição química e degradabilidade *in vitro* e *in situ* e com a anatomia foliar (LEMPP et al., 2005) poder-se-á inferir o valor nutritivo precocemente em híbridos de *B. humidicola* e *B. decumbens* e com isso descartar genótipos de menor potencial de ganho de peso. Essas atividades farão parte de duas teses de mestrado, uma na Universidade Federal de Lavras por Ulisses Figueiredo, e outra na Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho (UNESP- Botucatu) por Simony Mendonça.

A avaliação criteriosa e extensa de grandes coleções de germoplasma permitiu que as cultivares de gramíneas forrageiras liberadas pela Embrapa representem mais de 90% do mercado de sementes comercializadas no Brasil. Mesmo assim, no caso de cultivares de braquiária para formação de pastagens perenes, há apenas cinco ou seis delas, todas apomíticas, ou seja de reprodução assexuada por sementes resultando em monocultivos clonais, cuja vulnerabilidade coloca em risco os sistemas produtivos, especialmente no Centro-Oeste, Norte e Sudeste do país. É, portanto muito importante gerar novas opções de cultivares a fim de reduzir o monocultivo e esse projeto pretende justamente realizar cruzamentos e avaliar progênies com vistas a selecionar candidatos a cultivares a serem avaliados em outros projetos integrantes dessa rede. Especialmente críticos são os casos de *B. decumbens*, de excelente adaptação a solos ácidos e bom desempenho no período seco, e com uma única cultivar em uso desde a década de 1960 e o de *B. humidicola*, que mesmo sendo praticamente a única opção de forrageira para solos com drenagem deficiente, possui apenas três cultivares registradas no MAPA. Ademais, com as mudanças climáticas previstas torna-se ainda mais relevante o desenvolvimento de novas cultivares do gênero *Brachiaria*, com maior produtividade, adaptadas às condições climáticas não favoráveis e de melhor valor nutritivo visando mitigar a emissão de gases de efeito estufa pelos bovinos pastejo, de forma a garantir a sustentabilidade desse agronegócio. Um projeto colaborativo entre o instituto Victorian AgriBiosciences (VABC) na Austrália e a Embrapa Gado de Corte visa produzir as primeiras plantas transgênicas de *Brachiaria brizantha* com biossíntese de lignina modificada por meio de *down-regulation* da expressão de genes específicos de lignificação (CCR e COMT). O silenciamento desses genes deverá melhorar a digestibilidade dessa forrageira com conseqüente menor emissão de gás metano por bovinos em pastejo, tornando a produção de proteína animal menos poluente. Os trabalhos já se encontram em andamento na Austrália e os primeiros 500 eventos deverão ser disponibilizados a partir do final de 2011, para avaliação em contenção (casas de

vegetação). Daí a premência da realização dos estudos de fluxo gênico previstos nesse projeto, que permitirão trabalhar com biossegurança e estabelecer distâncias seguras e limitar escape de genes em futuros trabalhos envolvendo eventos transgênicos no campo. Esse estudo será o trabalho de mestrado do aluno Bruno Paniago, no programa da UCDB.

A grande importância dos trabalhos de melhoramento genético reside exatamente na possibilidade de criar e selecionar novos genótipos indefinidamente e com isso promover a diversificação local, regional e nacional das pastagens. Os trabalhos de melhoramento vêm sendo realizados desde a década de 1990 e já existem genótipos elite para integrar todos os projetos dessa rede, tanto para avaliação sob estresse bióticos, abióticos, produção de sementes sendo que dois híbridos deverão integrar os testes de DHE, VCU corte e um deles VCU sob pastejo. Novos híbridos elite serão selecionados ao final das avaliações de progênes de *B. humidicola* e de *B. decumbens* previstas neste projeto.

## 5. Objetivos Gerais

O objetivo geral do projeto é oferecer novas opções de *Brachiaria* pela geração e seleção de genótipos candidatos a novas cultivares para formação de pastagens. Visa ainda determinar o fluxo gênico em *B. brizantha* a fim de estabelecer padrões de biossegurança para futuros ensaios de campo com plantas transformadas.

### 5.1 Objetivos Específicos

1. Obter progênes de primeira geração de seleção em população sexual de melhoramento, com base no intercruzamento de híbridos sexuais previamente selecionados;
2. Analisar a variabilidade intrapopulacional das progênes de meios-irmãos sexuais com vistas a estimar componentes genéticos, fenotípicos e ambientais para os caracteres de valor agrônômico (produtividade, porcentagem de folhas, incidência de pragas, florescimento e produção de sementes);
3. Determinar por meio de análises citogenéticas, o comportamento cromossômico e viabilidade polínica dos genitores a serem usados na seleção recorrente, bem como dos híbridos selecionados.
4. Avaliar as características químicas, físicas e anatômicas das folhas como subsídio à seleção de genitores de maior valor nutritivo para ruminantes;
5. Selecionar genitores e indivíduos das progênes na população sexual avaliada experimentalmente, com base em seus valores genéticos preditos para os caracteres de valor agrônômico;
6. Realizar cruzamentos controlados entre genitores apomíticos e sexuais com alta capacidade específica de combinação, divergentes quanto à tolerância aos estresses abióticos, visando a obtenção da população  $F_1$  e, a seguir, a primeira geração de autofecundação ( $S_1$ );
7. Realizar cruzamentos controlados entre genitores apomíticos e sexuais com alta capacidade específica de combinação, divergentes quanto à resistência à cigarrinhadas-pastagens, visando a obtenção da população  $F_1$  e, a seguir, a primeira geração de autofecundação ( $S_1$ );
8. Identificar indivíduos híbridos dos resultantes de auto-fecundação e apomíticos daqueles sexuais com base em marcadores moleculares. (RAPD e SSR) em progênes de *B. decumbens* e de *B. humidicola*.

9. Determinação do fluxo gênico por dispersão de pólen e de sementes, com o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites, a fim de estabelecer padrões de biossegurança para ensaios de campo com *Brachiaria* transgênica.

## 6. Metas

Meta	Estado Atual	Indicador da Meta
Realizar parte do primeiro ciclo de seleção recorrente recíproca no melhoramento genético de <i>Brachiaria</i>	Processo não iniciado	50% do processo realizado até o final do projeto
Caracterizar 20 híbridos e 10 genitores/ano quanto ao comportamento cromossômico e viabilidade polínica	Três híbridos e cinco genitores com anormalidades e níveis variados de esterilidade	Número de genótipos caracterizados quanto à citogenética
Caracterizar 20 híbridos e 10 genitores/ano quanto a anatomia foliar relacionada ao valor nutritivo	Cinco genitores sexuais e três apomíticos estudados	Número de genótipos superiores identificados
Caracterizar 50 híbridos e 3 genitores ( <i>B. decumbens</i> ) quanto a resistência ao cisalhamento foliar relacionada ao valor nutritivo	Dois genitores (um apomítico e outro sexual) 50 híbridos sendo estudados na progênie de <i>B. humidicola</i>	Número de genótipos superiores identificados
Realizar cruzamentos SEX x APO entre genitores divergentes para obter 20 a 40 híbridos com tolerância a cada estresse	Dois híbridos APO com resistência a cigarrinhas	Número de híbridos identificados
Realizar autofecundação para obter híbridos sexuais divergentes quanto a tolerância à seca, alagamento, alumínio tóxico, e resistência a cigarrinhas-pastagens	Nenhuma população	Número de populações de 150 a 200 híbridos sexuais divergentes
Estabelecer distâncias de dispersão de pólen de <i>B. brizantha</i> no campo para estudos de fluxo gênico	Campos experimentais disponíveis para análise de fluxo transgênico com plotagem circular, mas nenhuma informação disponível quanto à dispersão de pólen	Distância máxima em metros onde ocorreu pólen viável de <i>B. brizantha</i> e introgressão de genes da cv. Marandu
Avaliação em híbridos produzidos a campo (fluxo gênico por meio de pólen de <i>B. brizantha</i> ) por meio de	Primers de marcadores microssatélites diferenciadores disponíveis	Número de híbridos encontrados a distâncias pré-estabelecidas

marcadores moleculares		
Avaliação no campo, da dispersão de sementes de <i>Brachiaria</i>	Metodologia definida para quantificar a dispersão por sementes	Número de sementes viáveis encontradas a distâncias pré-estabelecidas

## 7. Inserção do projeto na Rede

Esse projeto, conforme ilustrado na Figura 1 constitui o início do processo de desenvolvimento de novas cultivares de braquiária, por envolver atividades de geração de híbridos e de seleção preliminar de genótipos promissores. A partir dos resultados obtidos neste projeto serão identificados os genótipos a integrarem as atividades dos demais projetos. Ao mesmo tempo, resultados de seleção frente a estresses bióticos e abióticos e de produção de sementes retro-alimentarão o melhoramento, pois permitirão identificar quais materiais deverão compor como genitores os novos ciclos de recombinação. Como o programa de melhoramento já vem caminhando a mais de uma década no caso de híbridos interespecíficos, já existem genótipos superiores selecionados para compor essa rede em toda a sua extensão, isto é, todos os projetos ilustrados na Figura 1 têm genótipos de *Brachiaria*, entre outros, para serem avaliados no processo de desenvolvimento de novas cultivares. No caso dos programas com *B. humidicola* e *B. decumbens* o processo está ainda na fase inicial. Quanto ao estudo de fluxo gênico, a expectativa é iniciar avaliações de eventos transformados em casa de vegetação já a partir de 2012 e no campo entre 2014-2015 dentro de um processo de desenvolvimento de uma cultivar derivada da *B. brizantha* cv. Marandu com menores teores de lignina até 2017.

## 8. Metodologias

### SUB-PROJETO 1 - OBTENÇÃO DE POPULAÇÕES MELHORADAS COM FOCO NA EXPLORAÇÃO DE ESPÉCIES APOMÍTICAS

#### Ação 1.1: Recombinação e seleção em populações sexuais geradas a partir de materiais apomíticos

Será utilizada a metodologia de seleção recorrente proposta por SOUZA JUNIOR (1987) com modificações, onde são obtidas progênies do ciclo de seleção seguinte ao mesmo tempo em que se realiza a recombinação das progênies selecionadas do ciclo anterior. Isto é, em um ciclo, serão produzidas as progênies de meios-irmãos a serem utilizadas tanto para avaliação (unidade de seleção) como para recombinação (unidade de recombinação). No ciclo seguinte, como unidade de seleção, também serão utilizadas progênies de meios-irmãos. Entretanto, para recombinação, serão utilizados os genitores que deram origem a estas progênies selecionadas.

Neste ciclo inicial serão obtidas progênies de meios-irmãos, tanto para avaliação quanto recombinação. Para tal, será instalada uma área de cruzamentos arranjada em esquema de blocos casualizados, com 8 repetições, e parcelas quadradas de 1m x 1m, formadas com plantas clonadas de cada material genético a ser recombinado (20 híbridos interespecíficos já avaliados de *B. ruziziensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha*), onde espera-se a obtenção de pelo menos 20 progênies. Essa área será isolada física e espacialmente, visando evitar a contaminação por pólen externo proveniente de plantas apomíticas. Além disso, será realizada a manutenção periódica do experimento e entorno visando a eliminação de braquiárias diferentes daquelas que estarão sob recombinação.



Serão realizadas correção e adubação necessária determinada pela análise do solo do local, onde a adubação de manutenção será aquela adequada à indução de florescimento e produção de sementes. Caso seja necessário, será empregada irrigação. Acompanhar-se-á a fenologia do florescimento e da produção de sementes, sendo que estas serão colhidas de parcelas individuais para obtenção das progênies de meios-irmãos da população sexual. Devido à degrana natural das sementes, serão usadas telas junto ao solo visando facilitar esta coleta.

### **Ação 1.2: Avaliação experimental das progênies de meios-irmãos de *B. humidicola***

Será realizado um teste de progênies de meios-irmãos de *B. humidicola*, visando à seleção entre e dentro de famílias. Neste, serão selecionados os melhores genitores com base na progênie e, também, os melhores indivíduos dentro das progênies. Para tal, o delineamento experimental será em blocos ao acaso, com 10 repetições e parcelas com 5 plantas, avaliadas individualmente para produção de matéria seca foliar, do colmo e total; capacidade de rebrota e produção de sementes.

As 20 melhores plantas por família serão avaliadas quanto à força de cisalhamento, características morfológicas e composição química, caracteres esses associados à qualidade da forragem (HUGHES et al., 2000; HERRERO et al., 2001). Para tal, serão amostradas 15 lâminas de cada planta selecionada, no período das águas (4 avaliações) e da seca (1 avaliação). Pesar-se-á (g) cada grupo de três folhas, através de balança analítica, para cada um dos genótipos obtidos. A seguir, será medido o comprimento de cada lâmina (cm), utilizando-se uma régua. Medir-se-á também a largura da folha nas 3 lâminas de cada grupo. A resistência ao cisalhamento das três folhas agrupadas será medida através de aparelho Texturômetro, dotado de lâmina tipo Warner-Blatzer, comumente utilizada para avaliar maciez em carne. Os seguintes parâmetros serão calculados: densidade linear (média do peso/ média do comprimento), resistência por unidade de largura (média da força/ média das larguras) e resistência por unidade de densidade linear (média da força/ densidade linear). Além disso, uma amostra seca e moída das folhas será utilizada para determinação da matéria orgânica, proteína bruta, digestibilidade *in vitro*, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, celulose e lignina, usando-se espectrometria de refletância por infravermelho próximo (NIRS), segundo MARTEN et al. (1985). Cerca de 10% das amostras serão analisadas via úmida: matéria orgânica, proteína bruta segundo AOAC (1990), digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica segundo TILLEY e TERRY (1963) modificado por MOORE e MOTT (1974), e fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e lignina de acordo com GOERING e VAN SOEST (1970).

### **Ação 1.3: Geração de populações superiores a partir do cruzamento de cultivares apomíticas elites e sexuais selecionadas**

Serão realizados cruzamentos controlados entre genitores apomíticos e sexuais previamente selecionados. As características dos parentais são apresentadas na Tabela 1.

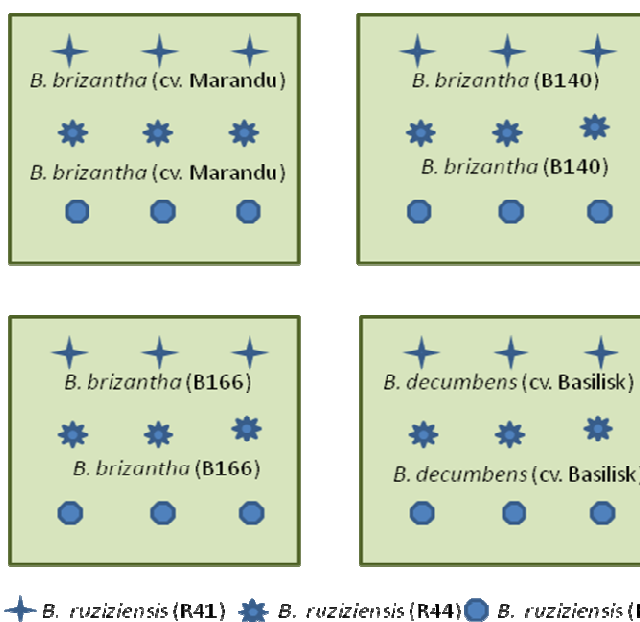
Para obtenção dos cruzamentos, serão adotadas duas estratégias:

- 1) com lotes isolados a campo, onde os genitores sexuais serão dispostos em touceiras isoladas e circundados por cada um dos genitores apomíticos, totalizando quatro blocos de cruzamentos e três touceiras de cada genitor sexuais por bloco (Figura 2);
- 2) em casa de vegetação, com os genitores sexuais em vasos. Nesta, por ocasião do florescimento, será utilizado pólen coletado em inflorescências dos genitores apomíticos trazidos do campo e mantidos em vasos com água no laboratório. Espera-se a

obtenção de pelo menos 12 progênies de irmãos germanos, que serão submetidas à seleção entre e dentro das progênies.

**Tabela 1.** Genitores utilizados para obtenção das progênies de irmãos germanos

Genitor masculino	
Espécie	Características
<i>B. brizantha</i> (cv. Marandu)	Apomítica, resistente à cigarrinha-das-pastagens, alta produtividade, intolerante ao alagamento
<i>B. brizantha</i> (B140)	Apomítica, resistente à cigarrinha-das-pastagens, alta produtividade
<i>B. brizantha</i> (B166)	Apomítica, suscetível à cigarrinha-das-pastagens, alta produtividade
<i>B. decumbens</i> (cv. Basilisk)	Apomítica, suscetível à cigarrinha-das-pastagens, média-alta produtividade, tolerante à seca e a mais tolerante ao alumínio tóxico entre as gramíneas cultivadas
Genitor feminino	
Espécie	Características
<i>B. ruziziensis</i> (R41)	Sexual, suscetível à cigarrinha-das-pastagens, elevada qualidade protéica
<i>B. ruziziensis</i> (R44)	Sexual, suscetível à cigarrinha-das-pastagens, elevada qualidade protéica
<i>B. ruziziensis</i> (R46)	Sexual, suscetível à cigarrinha-das-pastagens, elevada qualidade protéica



**Figura 1:** Esquema de cruzamento a campo, envolvendo genitores sexuais e apomíticos em *Brachiaria*

Nesta etapa, as progênies serão avaliadas experimentalmente quanto ao potencial produtivo para todos os critérios de seleção comumente empregados em gramíneas forrageiras (acúmulo de matéria seca do colmo, foliar e total; capacidade de rebrota e produção de sementes). O delineamento experimental será de blocos ao acaso com 10 repetições de cinco plantas por parcela. Também será realizada a identificação do modo de reprodução dos mesmos, pois indivíduos apomíticos são candidatos a nova cultivar, usufruindo-se da vantagem da apomixia no gênero.

Para a determinação da força de cisalhamento, características morfológicas e composição química será utilizada a mesma metodologia descrita para as progênies de meios irmãos.

As análises dos dados obtidos nas atividades 3 e 4 serão realizadas empregando-se o Software Selegen Reml/ Blup (RESENDE, 2002b). Serão estimados os parâmetros genéticos e fenotípicos, em modelos univariados, e preditos os valores genéticos e genotípicos dos materiais sob seleção para cada variável e, também, com base em índice de seleção visando o ganho em mais de uma variável como critério de seleção. Sempre com base nessas análises, serão selecionadas progênies para continuarem nas sucessivas etapas do programa de melhoramento.

Como resultado dos cruzamentos entre genótipos apomíticos e sexuais obtém-se progênies híbridas, segregando em 1:1 para modo de reprodução apomítico:sexual. As progênies de irmãos germanos (resultantes dos cruzamentos entre acessos sexuais de *B. ruziziensis* e acessos apomíticos elites) serão caracterizadas quanto ao modo de reprodução por meio de análise de sacos embrionários clarificados, segundo técnica descrita por YOUNG et al. (1979), analisados por microscopia de contraste de interferência. Tal procedimento será adotado apenas para os materiais selecionados. Deve-se enfatizar que os indivíduos apomíticos resistentes e tolerantes aos estresses deverão ser avaliados agronomicamente, pois serão candidatos a novas cultivares, uma vez que os cruzamentos foram realizados entre genitores com elevada capacidade específica de combinação. Os indivíduos sexuais divergentes serão autofecundados para obtenção da geração S1. A identificação de plantas resultantes de autofecundação acidental poderá ser realizada por marcadores moleculares sempre que os mesmos estejam disponíveis, para que se trabalhe especificamente com híbridos dos cruzamentos planejados.

#### **Ação 1.4: Avaliação de híbridos de *B. decumbens* quanto a produtividade e características físicas, e químicas anatômicas (tema de mestrado de Simony Mendonça – UNESP-Botucatu)**

O experimento será conduzido Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, em solo Latossolo Roxo Álico. Numa avaliação preliminar e individual de híbridos intraespecíficos, obtidos a partir de cruzamentos entre acessos sexuais tetraploidizados artificialmente de *B. decumbens* e a cv. Basilisk apomítica, serão selecionados os 50 mais promissores, com base em caracteres qualitativos de vigor, densidade de folhas, e florescimento.

O ensaio será instalado no delineamento de blocos ao acaso com quatro plantas por parcela e quatro repetições. A implantação do ensaio será por mudas e incluirão os 50 híbridos, e seus dois genitores como testemunhas. O espaçamento entre plantas nas linhas será de 1m e 1,5m entre linhas, com área útil da parcela de 3m<sup>2</sup>. A avaliação da produção de progênies de *B. decumbens* será feita com base na produção de matéria seca total, foliar, colmo e material morto (kg.ha<sup>-1</sup>); porcentagem de folhas; rebrota e vigor (notas de 1 a 5), que serão avaliados em cinco cortes por ano, sendo três cortes de chuvas e um corte no

meio da seca e outro ao final da seca, em todas as plantas na parcela, após um corte de uniformização.

O valor nutritivo será obtido através de análises químicas para determinação da matéria orgânica, proteína bruta, digestibilidade *in vitro*, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose e lignina, em amostras usando-se espectrometria de infravermelho (NIRS - MARTEN et al., 1985) em todos os cortes.

A caracterização do modo de reprodução dos híbridos será avaliada por meio das características morfológicas do saco embrionário usando o clareamento de ovários (YOUNG et al., 1979) e microscopia por contraste de interferência.

A análise dos dados será realizada empregando-se o Software SELEGEN REML/BLUP (RESENDE, 2002b). Como cada variável será avaliada em várias medições em cada ano, será realizada uma análise univariada para cada corte, visando considerar a questão da heterogeneidade de variância entre cortes. Desta forma será empregado o um modelo linear misto (avaliação de clones, no delineamento em blocos ao acaso, avaliando-se o total de parcela, uma medição por indivíduo, um só caráter).

As avaliações anatômicas serão conduzidas nos 50 híbridos e nos dois genitores de duas repetições. As avaliações anatômicas serão realizadas na UFGrande Dourados, Dourados, MS e compreenderão a proporção relativa dos tecidos, observação dos sítios de compostos fenólicos ao longo da seção transversal, arranjo dos diferentes tecidos e arquitetura das células da epiderme. Serão amostrados fragmentos das lâminas foliares da forragem e processados segundo DAYKIN e HUSSEY (1985) para avaliação da proporção relativa dos tecidos. As amostras serão coradas e analisadas segundo HAGQUIST (1974). A mensuração dos tecidos será feita por sistema analisador de imagens acoplado a um microscópio binocular. As observações dos sítios de compostos fenólicos serão feitas em microscópio óptico e seções representativas serão registradas. As células da epiderme, abaxial e adaxial, serão isoladas utilizando-se o método descrito por THEUNISSEN (1989). O arranjo e sinuosidade das células, bem como da sílica serão verificados por meio de microscópio binocular. Para análise estatística dos resultados das análises por microscopia, utilizar-se-á o delineamento com casualização completa, fazendo-se análises para águas e seca separadamente. A comparação de médias de quantidade de tecidos e frequência de ocorrência de estruturas será realizada pelo teste de Tukey (significância de 5%). Para a análise dos dados utilizar-se-á o PROC GLM, do pacote estatístico SAS (1996).

#### **Ação 1.5: Estudo do comportamento citológico em acessos e híbridos intra e interespecíficos de *Brachiaria* (temas de pós-graduação de alunos na Universidade Estadual de Maringá)**

Inflorescências jovens, ainda envolvidas pela folha bandeira, serão colhidas e fixadas em 6:3:2 (partes de álcool etílico: 3 partes de clorofórmio: 2 partes de ácido propiônico) por 24 horas. Após este período, o material será lavado com álcool 70% e transferido para novo álcool a 70% e, em seguida, acondicionado sob refrigeração, até o momento de se iniciar as análises meióticas. Os microsporócitos serão preparados pela técnica de esmagamento e corados com carmim propiônico a 0,5%.

Para determinação do número de cromossomos serão analisadas, no mínimo, 20 células por acesso, nas fases de diacinese ou metáfase I/anáfase I. Para esta análise, procurar-se-á selecionar as células que estiverem apresentando o mesmo grau de condensação cromossômica. Durante a contagem dos cromossomos e avaliação do grau de afinidade genômica entre as espécies, as associações cromossômicas serão cuidadosamente desenhadas, levando-se em consideração a presença de cromossomos univalentes e associações cromossômicas multivalentes. Para o estudo do comportamento

meiótico, serão analisadas aproximadamente 1.000 células por acesso, representando as diferentes fases da divisão. Após a meiose, a microgametogênese será avaliada. Naqueles acessos em que se fizer necessário, esta será detalhadamente avaliada com relação ao desenvolvimento do grão de pólen. Testes de fertilidade de pólen através do uso de diferentes corantes serão efetuados em diferentes épocas de florescimento. Todas as anormalidades meióticas serão consideradas e as mais representativas serão fotografadas em filme preto e branco, Kodak Imagelink – HQ Asa 25.

### **Ação 1.6: Avaliação multilocacional de híbridos de *B. humidicola* e híbridos de *B. decumbens*.**

Os experimentos serão conduzidos nas Embrapas Gado de Corte, Campo Grande, MS; Cerrados, Planaltina, DF e Acre, Rio Branco, AC. Os ensaios serão instalados no delineamento de blocos ao acaso com três plantas por parcela e 4 repetições. A implantação do ensaio será por mudas. O ensaio incluirá 15-20 clones híbridos além de seus dois genitores e a cultivar comercial como testemunha. O espaçamento entre plantas nas linhas será de 1 m e 2 m entre linhas, sem bordaduras.

Os parâmetros avaliados incluirão:

– *Produção:*

Os caracteres produção de matéria seca total, foliar, colmo e material morto ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ); porcentagem de folhas; rebrota e vigor (notas de 1 a 5) serão avaliados em três cortes por ano, em todas as plantas na parcela. Os cortes nas parcelas serão duas vezes no período de chuvas (Fevereiro e Abril) e outra no final do período seco (setembro).

– *Valor nutritivo:*

Análises químicas apenas de amostras secas e moídas das folhas e colmos serão utilizadas na determinação da matéria orgânica, proteína bruta, digestibilidade in vitro, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose e lignina, usando-se espectrometria de infra vermelho (NIRS - MARTEN et al., 1985) nos três cortes a cada ano.

– *Avaliação qualitativa:*

Antes de cada corte serão feitas avaliações qualitativas, por meio de notas, do vigor (1 = baixo a 5 = alto), estágio de florescimento (1 = vegetativo; 2 = início; 3 = franco e 4 = final) e presença ou ausência de insetos (1 e 0, respectivamente), para todas as parcelas.

– *Rebrota:*

A rebrota será estimada sete dias após o corte, com notas de densidade (1= menos de 20 % dos perfilhos rebrotados; 2= 20-40 %; 3= 40-60 %; 4= 60-80 %; e 5= mais de 80 %) e velocidade de colmos rebrotados (baixa, média e alta de crescimento em altura). A nota final de rebrota é dada por uma combinação das duas notas.

A análise dos dados será realizada empregando-se o Software SELEGEN REML/BLUP (RESENDE, 2002b). Como cada variável foi avaliada em várias medições em cada ano, será realizada uma análise univariada para cada corte, visando considerar a questão da heterogeneidade de variância entre cortes. Desta forma será empregado o seguinte modelo linear misto (avaliação de clones, no delineamento em blocos ao acaso, avaliando-se o total de parcela, uma medição por indivíduo, um só caráter):

$y = Xb + Zg + e$ , em que:

y, b, g e e: vetores de dados, dos efeitos de blocos (fixos), de efeitos genotípicos de clones (aleatórios) e de erros aleatórios.

X e Z: matrizes de incidência para b e g, respectivamente.

A seqüência de colunas no arquivo de dados para análise no software SELEGEN REML/BLUP (modelo 20) será:

Indivíduo Clone Bloco Planta Variáveis

Baseados nos resultados dessa análise inicial, se necessário, os dados de todos os caracteres serão padronizados, considerando o período (seca ou chuvas), usando o seguinte procedimento:

$P_i = \text{m\u00e9dia do corte} \times (1 - \sigma_{Fm}/\sigma_{Fc}) + \text{Dado bruto} \times \sigma_{Fm}/\sigma_{Fc}$ , em que:

$\sigma_{Fm}$  : desvio padr\u00e3o fenot\u00edptico m\u00e9dio (todos os cortes dentro do per\u00edodo)

$\sigma_{Fc}$  : desvio padr\u00e3o fenot\u00edptico do car\u00e1ter no corte.

Para a an\u00e1lise conjunta dos cortes, as vari\u00e1veis padronizadas s\u00e3o analisadas considerando todos os cortes em cada per\u00edodo, segundo modelo univariado de clones, em blocos, com v\u00e1rias plantas na parcela (total de parcela) e medidas repetidas. Modelo linear misto:

$y = Xb + Zg + Tp + e$ , em que:

p: vetor de efeitos permanentes;

T: matriz de incid\u00eancia para p.

A seq\u00fc\u00eancia de colunas no arquivo para an\u00e1lise (modelo 29) ser\u00e1:

Indiv\u00edduo Clone Bloco-Me-di\u00e7\u00e3o Permanente Planta (coluna de 1) Vari\u00e1veis

Neste modelo ser\u00e1 ajustado um \u00fanico efeito fixo (denominado combina\u00e7\u00e3o bloco-medida\u00e7\u00e3o) procedimento estatisticamente correto, bem como, desej\u00e1vel e necess\u00e1rio do ponto de vista computacional (RESENDE, 2002a).

Estimar-se-\u00e1 a herdabilidade individual no sentido amplo no bloco em uma dada medida\u00e7\u00e3o; a repetibilidade individual no bloco; o coeficiente de determina\u00e7\u00e3o dos efeitos de bloco e o coeficiente de determina\u00e7\u00e3o dos efeitos permanentes.

Na sele\u00e7\u00e3o de clones (indiv\u00edduos), visando o melhoramento gen\u00e9tico e ganho para v\u00e1rios caracteres simultaneamente, nos per\u00edodos de \u00e1guas e seca, ser\u00e1 adotado o seguinte \u00edndice:

$I = \sum_{i=1}^n vg_i \times \text{peso}_i \times (1/\sigma_{gi})$ , em que:

$vg_i$  : valor genot\u00edptico do clone para o car\u00e1ter i;

$\text{peso}_i$  : import\u00e2ncia proporcional do car\u00e1ter i;

$\sigma_{gi}$  : desvio padr\u00e3o genot\u00edptico estimado para o car\u00e1ter i (para padroniza\u00e7\u00e3o da unidade de medida\u00e7\u00e3o).

Os clones s\u00e3o ordenados com base no \u00edndice, para fins de sele\u00e7\u00e3o. Com base nas informa\u00e7\u00f5es globais geradas neste trabalho ser\u00e1 feita a sele\u00e7\u00e3o de h\u00edbridos promissores, a serem multiplicados para ensaios espec\u00edficos de resist\u00eancia a cigarrinhas e ensaios regionais.

Na an\u00e1lise conjunta dos v\u00e1rios locais e cortes, as vari\u00e1veis s\u00e3o analisadas considerando todos os cortes em todos os locais, segundo modelo linear misto: Modelos 69 e 151 (com estabilidade e adaptabilidade via BLUP)

$y = Xb + Zg + Tp + Si + e$ , em que:

i: vetor dos efeitos de intera\u00e7\u00e3o G x E

## **SUB-PROJETO 2: DETERMINA\u00c7\u00c3O DO FLUXO G\u00caNICO EM BRACHIARIA**

Ser\u00e3o feitos estudos baseados em campo para avaliar a dispers\u00e3o de sementes, a dispers\u00e3o de p\u00f3len e o fluxo g\u00eanico, em fun\u00e7\u00e3o da dist\u00e2ncia, utilizando-se diferentes esp\u00e9cies de *Brachiaria* (gen\u00f3tipos apom\u00edticos e sexuais). As coletas de braqui\u00e1rias nativas ser\u00e1 realizada pelo Dr. Jos\u00e9 Francisco de Montenegro Valls (Embrapa Cenargen) para incorpora\u00e7\u00e3o ao Banco Ativo de Germoplasma na Embrapa Gado de Corte, a fim de determinar modo de reprodu\u00e7\u00e3o e n\u00famero de cromossomos, com vistas a estabelecer

possibilidade de fluxo gênico entre a *B. brizantha* cv. Marandu e as braquiárias nativas. Estarão incluídas neste subprojeto as avaliações moleculares de fluxo gênico e com marcadores moleculares do tipo microsátélites (SSR), bem como análises citoembriológicas para determinação do modo de reprodução.

### Ação 2.1: Implantação do ensaio em campo:

Será conduzido um experimento no campo experimental da Embrapa Gado de Corte, município de Campo Grande-MS. Os ensaios serão instalados em dois locais, com delineamento concêntrico (Figura 2). No centro dos ensaios serão transplantadas oito mudas da cultivar Marandu, em uma área de 1 m de diâmetro, com espaçamento de 0,5 m entre as touceiras, de forma a garantir quantidade de pólen suficiente para manter a homogeneidade do estudo.

Mudas de genótipos de *B. ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente, com mesma época de florescimento e sexualmente compatíveis com a cultivar Marandu serão transplantadas em 15 linhas circulares concêntricas, distanciadas 3 m entre si, totalizando um raio de 45 m de avaliação. As touceiras de *B. ruziziensis* serão espaçadas em 0,7 m em cada uma das linhas. O experimento será implantado em áreas livres de ocorrência de *B. brizantha* e *B. ruziziensis*. A avaliação será feita em dois anos consecutivos, após o florescimento e a maturação das sementes.

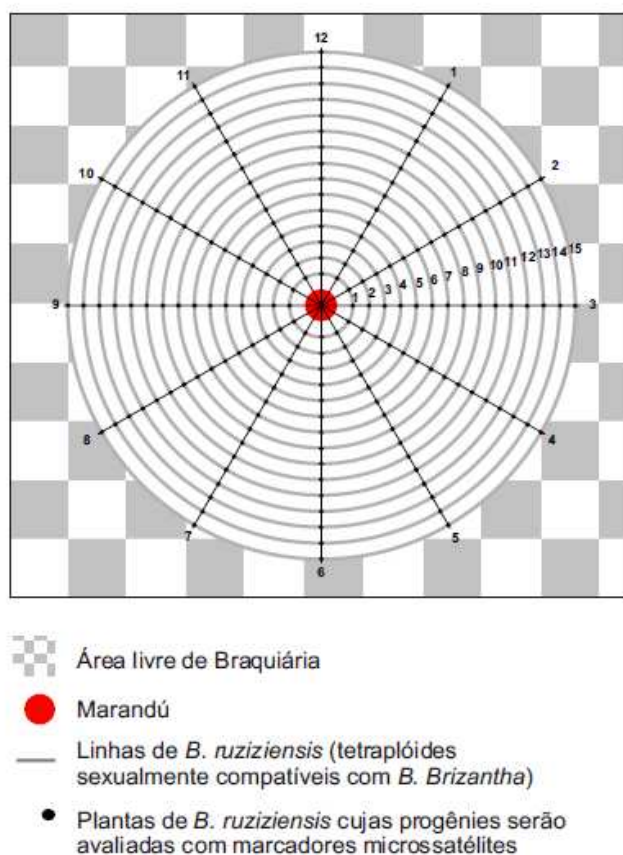


Figura 2: Esquema de experimento com delineamento concêntrico envolvendo *B. brizantha* (cultivar Marandu) como genitores apomíticos e genótipos de *B. ruziziensis* como genitores sexuais

### **Ação 2.2: Avaliação da dispersão de sementes:**

Para avaliar a dispersão de sementes que são deiscentes, serão utilizadas telas sobre o solo e sob as touceiras da cultivar Marandu e ao longo dos raios de avaliação. Quando do florescimento será acompanhada a queda de sementes e varredura das telas a cada dois dias. As sementes colhidas serão beneficiadas em soprador, separando-se sementes cheias de sementes chochas. Sementes das duas espécies podem ser separadas fenotipicamente pela pilosidade e formato da espigeta. Sementes híbridas serão germinadas separadamente para análises moleculares.

### **Ação 2.3: Avaliação da dispersão de pólen:**

A dispersão de pólen será realizada utilizando-se armadilhas caça-pólen. O pólen preso na armadilha será coletado e analisado para verificar sua viabilidade, por meio de corantes (Carmim propiônico, TCC e Lugol) e por germinação *in vitro* em solução de agarose. A contagem de pólen viável será feita em microscópio ótico comum, contando-se sempre mais do que 100 grãos de polens em pelo menos cinco campos óticos distintos.

### **Ação 2.4: Avaliação do fluxo gênico com marcadores moleculares:**

Marcadores moleculares do tipo microssatélites, previamente desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa para *B. brizantha*, e que sabidamente amplificam os genótipos de *B. ruziziensis* utilizados no experimento, serão testados nos parentais a fim de que sejam identificados os dez melhores locos para discriminação alélica dos mesmos, utilizando-se géis de poliacrilamida, conforme descrito por JUNGSMANN (2009) e JUNGSMANN et al. (2009a). Nos ensaios serão definidos 12 raios distanciados em 30°. O fluxo gênico de *B. brizantha* será avaliado nas progênies das plantas de *B. ruziziensis* localizadas nas intersecções entre os círculos concêntricos e estes raios, totalizando 180 famílias. Serão colocadas para germinar em casa de vegetação 20 sementes de cada família e, dentre as que germinarem, dez indivíduos serão escolhidos aleatoriamente para extração de DNA de amostras foliares segundo DOYLE e DOYLE (1987). Os DNAs dos indivíduos selecionados serão submetidos a reações de PCR em bulks de dez indivíduos, sendo um bulk por família, para análise com os 10 marcadores microssatélites previamente selecionados nos parentais. Os bulks cujas reações de PCR apresentarem alelos exclusivos de *B. brizantha* serão abertos para avaliações isoladas dos indivíduos da progênie.

As reações de PCR serão conduzidas em volume final de 25 µl contendo 20 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 ng DNA genômico; 0,8 µM cada primer; 150 µM dNTPs e 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), em programa consistindo de um ciclo inicial de desnaturação de 94°C (1 min), seguido de 30 ciclos de amplificação [94°C (1 min), X°C (1 min), 72°C (1 min)] e uma etapa final de extensão de 72°C (7 min), sendo X°C a temperatura específica de cada primer conforme descrito por JUNGSMANN (2009) e JUNGSMANN et al. (2009a). Caso seja necessário, ajustes de temperatura serão realizados utilizando-se termociclador com gradiente de temperatura. Os primers utilizados serão marcados com fluorescência (6-FAM e HEX). Os produtos de amplificação serão submetidos a eletroforese em géis de poliacrilamida (seleção de primers nos genitores) e eletroforese capilar (testes nas progênies) utilizando-se sequenciador automático Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems).

A presença de alelos exclusivos de *B. brizantha* nas progênies de *B. ruziziensis* será indicativa de efetividade na polinização destas plantas pelo genitor masculino testado. Após a coleta de dados, será aplicada metodologia estatística adequada ao delineamento do experimento visando estimar a significância dos resultados.

### **Ação 2.5: - Avaliação do modo de reprodução**



Flores em antese dos mesmos 10 híbridos selecionados para extração de DNA serão colhidas para verificação do modo de reprodução e comprovação de hibridação. O modo de reprodução dos híbridos será avaliado por meio das características morfológicas do saco embrionário. Para cada planta serão coletadas 40 inflorescências pela manhã e fixadas em FAA (Formaldeído: Ácido Acético: Álcool) por 24 horas em temperatura ambiente, transferidas para álcool 70% e acondicionadas em refrigerador, até a sua utilização. Os ovários serão extraídos com auxílio de lupa e depois desidratados e clarificados de acordo com o protocolo proposto por YOUNG et al. (1979). As análises serão realizadas em microscópio, por contraste de interferência: ovários com um único saco meiótico caracterizam plantas com modo de reprodução sexual enquanto ovários com sacos embrionários múltiplos ou apospórico único caracterizam plantas apomíticas. A taxa de sexualidade será calculada com base no número de ovários contendo apenas sacos meióticos em pelo menos 50 ovários.

### 9. Principais contribuições científicas ou tecnológicas da proposta, com ênfase nos benefícios esperados para a Região Centro-Oeste;

Este projeto tem condições de gerar informações de grande relevância para o desenvolvimento de cultivares bem como identificar e selecionar genótipos promissores para serem avaliados em fases mais avançadas do processo. As contribuições esperadas incluem avanços no conhecimento da herdabilidade de características agrônômicas relevantes em *Brachiaria*, o fortalecimento da interação entre as diferentes instituições envolvidas pela capacitação de jovens profissionais dentro dos programas de pós-graduação parceiros, resultando em publicações e participações em eventos que projetarão a região Centro-Oeste como expoente no melhoramento de *Brachiaria*.

A região Centro-Oeste será a grande beneficiada por novas cultivares para pastagens visando à diversificação e à redução de riscos ambientais dos grandes monocultivos atuais. A melhoria da produtividade e qualidade da forragem permitirá incrementos de produção sem a necessidade de abertura de novas áreas. A produção de sementes forrageiras está fortemente concentrada no Centro-Oeste e esse setor também será beneficiado pela geração de novas cultivares mais adaptadas, produtivas e com melhor valor nutritivo minimizando a emissão de gás metano por bovinos em pastejo.

### 10. Orçamento detalhado, incluindo previsão de participação de reuniões internas de acompanhamento e integração dos projetos da Rede

#### Coordenação do Projeto

<b>Custeio</b>			
<b>Discriminação do item</b>	<b>Valor unitário</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor total</b>
Serviços de terceiros (pessoa física ou jurídica) – Conserto de equipamentos de laboratório e manutenção de lupas e microscópios	5.000,00	1	5.000,00
<b>Total Custeio</b>			<b>5.000,00</b>
<b>Passagens e diárias</b>			
Passagens para participação em reuniões anuais de acompanhamento e avaliação	1.500,00	3	4.500,00
Passagens para atividades de pesquisa em	1.000,00	5	5.000,00

biologia molecular em Brasília			
Diárias para participação em reuniões anuais de acompanhamento e avaliação do projeto	187,83	15	2.817,45
Diárias para atividades de pesquisa em Brasília	187,83	20	3.756,60
			<b>16.074,05</b>
<b>Bolsas</b>			
Mestrado - GM	1.200,00	2 bolsas (24 meses)	57.600,00
Bolsa de Apoio técnico NS	550,00	2 bolsas (36 meses)	39.600,00
<b>Total Bolsas</b>			<b>97.200,00</b>
<b>TOTAL</b>			<b>118.274,05</b>

### Subprojeto 1

Discriminação do item	Valor unitário	Quantidade	Valor total
<b>Custeio</b>			
Aubos e corretivos	diversos	1	2.000,00
Material de embalagem (sacos de papel e plásticos)	diversos	1	4.000,00
Estacas de identificação, etiquetas, material de expediente, material de processamento de dados	diversos	1	3.000,00
Reagentes para análises de valor nutritivo	diversos	1	8.000,00
Reagentes para análises citogenéticas	diversos	1	3.000,00
<b>Total Custeio</b>			<b>20.000,00</b>

### Subprojeto 2

Discriminação do item	Valor unitário	Quantidade	Valor total
<b>Custeio</b>			
Aubos e corretivos	diversos	1	5.000,00
Formicida e herbicida	diversos	1	3.000,00
Telas para coleta de sementes	50,00/m	100 m	5.000,00
Reagentes para determinação do modo de reprodução e viabilidade polínica	diversos	1	3.500,00
Reagentes para extração de DNA (Tris, EDTA, NaCl, CTAB, HCl, 2-mercaptoetanol, Clorofórmio, Álcool Isoamílico, Isopropanol, Etanol e RNase)	diversos	1	12.000,00
Reagentes para confecção de géis de poli(acrilamida) (Acilamida, Bis-Acrlamida,	diversos	1	15000,00

Persulfato de Amônio, TEMED, Tris, Ácido Bórico, EDTA, Uréia, Hidróxido de Sódio)			
Reagentes para coloração de géis de poliacrilamida (Ácido Acético, Etanol, Ácido Nítrico, Nitrato de Prata, Carbonato de Sódio, Formaldeído)	diversos	1	10.000,00
Primers marcados com fluorescência	602,19	16	9635,04
Taq DNA polimerase	280,00	42	11.760,00
Capilares para eletroforese em Analisador Automático de DNA ABI PRISM modelo 3130. Suficiente para 150 corridas	2265,89	33	74774,37
Polímero de Performance Otimizada POP 7 para análise de fragmentos de DNA. Utilizado como matriz para eletroforese Analisadores Automáticos de DNA Applied Biosystems 3130 e 3130xl. Suficiente para 960 amostras	1358,32	21	28524,72
Formamida Hi-Di, suficiente para 80 corridas	92,88	30	2786,40
Solução tampão EDTA, suficiente para 200 corridas			2092,65
Padrão de Peso Molecular Genescan-500 LIZ, marcados com fluorescência, suficiente para até 800 análises			28225,75
Padrão de Matriz DS-33 (6-FAM, VIC, NED, PET e LIZ)			1474,44
Vidrarias e plásticos consumíveis (placas de PCR, ponteiras e tubos)	10000,00	1	10000,00
<b>Total Custeio</b>			<b>222.773,37</b>
<b>Capital</b>			
Sistema de Fotodocumentação Molecular Imager GelDoc XR System BioRad com impressora	US\$ 13150	1	26.300,00
<b>Despesas com importação (18%)</b>			<b>4734,00</b>
<b>Justificativas quanto à imprescindibilidade:</b>			
Este sistema de fotodocumentação será imprescindível para a documentação dos géis de agarose corados com Brometo de Etídio e para a documentação e análise dos géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata.			
Termociclador C 1000 Thermal Cycler com módulos de reação para 96 amostras (com gradiente de temperatura) e 384 amostras	US\$ 11250	1	22.500,00
<b>Despesas com importação (18%)</b>			<b>4050,00</b>
<b>Justificativas quanto à imprescindibilidade:</b>			
Este termociclador será imprescindível para a realização do projeto, uma vez que somente através da sua aquisição será possível processar o grande número de reações de PCR com marcadores microssatélites estimado (cerca de 20.000 reações). O módulo de 96 amostras está sendo solicitado porque com ele é possível conduzir reações de PCR utilizando-se gradiente de temperatura, o que se fará necessário para ajuste das condições térmicas de			

<p>amplificação dos microssatélites em <i>B. ruzizensis</i> e suas progênes. O módulo de 384 amostras está sendo solicitado para permitir que um grande número de reações de PCR possam ser conduzidas simultaneamente, o que permitirá que o projeto seja realizado dentro do prazo previsto. O Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Gado de Corte não conta atualmente com nenhum equipamento que tenha esta capacidade de processamento de amostras.</p>			
Computador Dell Vostro Desktop		1	3.000,00
<p><b>Justificativas quanto à imprescindibilidade:</b> Este computador está sendo solicitado para realização das análises estatísticas pertinentes ao projeto e para ser utilizado por <b>dois</b> estudantes de mestrado que estarão envolvidos no projeto, para elaboração de suas teses</p>			
Conjunto de 3 micropipetas monocanais (1-10ul, 10-100ul, 100-300ul)	US\$ 2000	1	4.000,00
<b>Despesas com importação (18%)</b>			<b>720,00</b>
<p><b>Justificativas quanto à imprescindibilidade:</b> Este conjunto de micropipetas está sendo solicitado para ser utilizado no processamento das amostras durante a extração de DNAs das plantas a serem analisadas, uma vez que os DNAs vegetais serão extraídos de cada indivíduo isoladamente.</p>			
Conjunto de 3 micropipetas multicanais (1-10ul, 10-100ul, 100-300ul)	US\$ 4000	1	8.000,00
<b>Despesas com importação (18%)</b>			<b>1440,00</b>
<p><b>Justificativas quanto à imprescindibilidade:</b> Este conjunto de micropipetas está sendo solicitado para ser utilizado na montagem das reações de PCR em placas de 96 e 384 poços e no preparo das amostras para serem submetidas a eletroforese em géis de poli-acrilamida e a eletroforese capilar. A utilização de pipetas multicanais nesta etapa visará à redução de erros de pipetagem que comumente acontecem quando se trabalha com placas contendo muitas amostras (especialmente placas de 384 poços), o que resultará na economia de reagentes. Além disso, o emprego destas micropipetas multicanais permitirá a otimização do tempo de montagem das placas de PCR, garantindo a factibilidade do projeto dentro do prazo.</p>			
Agitador orbital de bancada marca Thermo Scientific	US\$ 2737	1	5.474,00
<b>Despesas com importação (18%)</b>			<b>985,32</b>
<p><b>Justificativas quanto à imprescindibilidade:</b> Este agitador será utilizado no processo de coloração de géis de acrilamida mediada por prata, durante a fase de incubação com nitrato de prata que requer agitação constante e homogênea por 30 minutos para cada placa. O Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte não conta com equipamento que possa substituir este agitador.</p>			
Moinho para processamento de amostras foliares IKA Works A11 Basic Mill	US\$ 1175	1	4.700,00
<b>Despesas com importação (18%)</b>			<b>846,00</b>
<p><b>Justificativas quanto à imprescindibilidade:</b> Estes moinhos estão sendo solicitados para moagem das amostras foliares dos indivíduos que serão analisados.</p>			
Workstation epMotion Eppendorf 5075 LH, basic device for liquid handling, 200-240V, incluso acessórios	US\$ 62434	1	124.868,00
<b>Despesas com importação (18%)</b>			<b>22.476,24</b>

**Justificativas quanto à imprescindibilidade:**

Este equipamento consiste em um sistema de pipetagem automático da marca Eppendorf que deverá ser utilizado para a realização das pipetagens rotineiras de extração de DNAs, montagem e distribuição (em placas) de mixes de PCR e preparo de amostras para submissão a eletroforeses. Sua aquisição se justifica 1) pelo grande número de reações de extrações de DNA (no mínimo 1800 indivíduos) e de reações de DNA (cerca de 20.000 reações); 2) pela redução de erros amostrais em pipetagens realizadas por este tipo de aparelho, resultando assim em economia de insumos e 3) pela expressiva redução da necessidade de mão de obra proveniente do seu uso. Além da sua aplicação direta na realização deste projeto, este equipamento deverá ser multi-usuários e será utilizado na condução de outros projetos em andamento no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte. Com a sua aquisição, a capacidade de trabalho da equipe de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte será triplicada, o que representará maior produtividade sem que haja necessidade de contratação de mão de obra especializada. Isso ampliará as perspectivas da equipe para abraçar projeto de maior envergadura na área de genética molecular de espécies forrageiras tropicais. O uso do equipamento deverá beneficiar ainda projetos em andamento nas Universidades locais (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e Universidade Católica Dom Bosco), dada à parceria em Biologia Molecular existente entre a Embrapa Gado de Corte e estas instituições. O sistema de pipetagem aqui solicitado está sendo pedido em sua versão mais básica e poderá, futuramente, ser submetido a upgrades de acordo com a necessidade de uso. Todavia, apesar de estar sendo solicitado em uma versão básica, todos os acessórios necessários para a sua utilização (com exceção dos consumíveis) estão inclusos no valor requerido.

Estação meteorológica compacta (com instalação)		1	34.913
---	--	---	--------

**Justificativas quanto à imprescindibilidade:**

Essa estação compacta será utilizada para monitorar as condições climáticas no experimento de fluxo gênico (dispersão de pólen e de sementes) de *B. brizantha*: poderemos acompanhar a direção e velocidade do vento, temperatura do ar, umidade relativa e pluviosidade, contando com data logger para armazenamento de dados e baterias solares para manutenção da unidade.

Casa de vegetação		1	230.000
-------------------	--	---	---------

**Justificativas quanto à imprescindibilidade:** Essa casa de vegetação é imprescindível para a condução de cruzamentos controlados, germinação de híbridos, estudos de viabilidade polínica e será construída visando atender os requisitos de biossegurança a fim de requerer CQB para poder avaliar eventos transgênicos do projeto em colaboração com a Austrália. Estes deverão ser disponibilizados em 2012 para avaliação sob contenção na Embrapa Gado de Corte. A outra casa de vegetação da Embrapa Gado de Corte já está completamente comprometida com os outros programas de melhoramento da instituição.

<b>Total Capital</b>			<b>463.755</b>
<b>Despesas com importação</b>			<b>35.251,56</b>

**RESUMO DO ORÇAMENTO CONJUNTO (Sub-projetos 1 e 2)**

<b>CUSTEIO</b>	
<b>Coordenação do projeto</b>	7.817,45
<b>Sub-projeto 1</b>	20.000,00

<b>Sub-projeto 2</b>	<b>222.773,37</b>
<b>Despesas importação</b>	<b>35.251,56</b>
<b>TOTAL CUSTEIO</b>	<b>285.842,38</b>
<b>Passagens e diárias</b>	<b>16.074,05</b>
<b>CAPITAL</b>	
<b>Sub-projeto 2</b>	<b>463.754,34</b>
<b>TOTAL BOLSAS</b>	<b>97.200,00</b>
<b>TOTAL GERAL</b>	<b>862.870,77</b>

## 11. Cronograma físico-financeiro

DISPÊNDIO	Ano 1			Ano 2			Ano 3			TOTAL GERAL
	Semestre 1	Semestre 2	Sub-total	Semestre 1	Semestre 2	Sub-total	Semestre 1	Semestre 2	Sub-total	
<b>Financeiro</b>										
<b>CUSTEIO</b>										
Material de consumo	52139	50800	102939	55500	41052	96552	42260	32048	74308	273799
STPJ			0	5000		5000			0	5000
Passagens	1000	2500	3500	1500	2000	3500	2500		2500	9500
Diárias	939,15	1878,3	2817,45	939,15	1878,3	2817,45	1878,3		1878,3	7513,2
<b>CAPITAL</b>										
Equipamentos	230000	108887	338887	124868		124868			0	463755
<b>BOLSAS</b>										
Mestrado	14400	14400	28800	14400	14400	28800			0	57600
AT NS	6600	6600	13200	6600	6600	13200	6600	6600	13200	39600
<b>Total Geral</b>										<b>856767,2</b>

## 12. Disponibilidade efetiva de infraestrutura e de apoio técnico para o desenvolvimento do projeto

A Embrapa Gado de Corte, a Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), e a Universidade Estadual de Maringá tem se destacado em relação à produção científica, com grande número de projetos aprovados (FUNDECT, CNPq, FINEP, EMBRAPA), orientações e trabalhos publicados, o que permitiu a implantação e a qualidade dos Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia da UCDB (mestrado), e em Ciência Animal da UFMS (mestrado e doutorado), mestrado e doutorado em Genética e Melhoramento (UEM).

A Embrapa (Gado de Corte, Cerrados e Acre) tem área física em solos representativos do bioma cerrados e Amazônia, e contam com infra-estrutura e laboratórios equipados para a realização da maioria das atividades de campo propostas. Contam com campos experimentais, veículos e pessoal de apoio, além dos laboratórios para análises. A solicitação de uma casa de vegetação para a Embrapa Gado de Corte visa não comprometer as atividades em casas de vegetação de outros programas já em andamento. Esta deverá ser construída para atender os requisitos de biossegurança ( para concessão de Certificado de Qualidade em Biossegurança à CTNBio) e com isso poder avaliar eventos transgênicos de um projeto em colaboração com a Austrália que deverão ser

disponibilizados em 2012 para avaliação sob contenção na Embrapa Gado de Corte. Daí a importância em conduzir os estudos de fluxo gênico neste projeto.

Os laboratórios de citogenética e de nutrição animal contam com os equipamentos (microscópios de contraste de interferência, estereoscópios, Analisador de Ploidia, Equipamento NIRS, etc.) para realizar as análises previstas.

As universidades envolvidas (Universidade Católica Dom Bosco, Universidade Federal da Grande Dourados, Universidade Estadual de Maringá) já são parceiras nas atividades de melhoramento de *Brachiaria* e também contam com pesquisadores experientes na condução de experimentos, aliado ao crescente número de alunos de graduação e pós-graduação envolvidos, além de boa infra-estrutura, laboratórios e apoio técnico para realizar com sucesso as atividades propostas.

As atividades de melhoramento contam com aporte parcial de recursos de outras fontes (EMBRAPA, CNPq e UNIPASTO), porém será imprescindível poder contar com as bolsas de mestrado a fim de viabilizar a formação dos dois alunos envolvidos e duas bolsas AT NS para conseguir cumprir as metas das atividades de campo e laboratório nos dois subprojetos.

**13. identificação dos participantes do projeto, descrevendo as atividades de cada um deles;**

<b>Integrante</b>	<b>Titulação</b>	<b>CPF</b>	<b>Vinculação institucional</b>	<b>Atividades</b>	<b>Dedicação em horas/Mês</b>
Dr. Allan Kardec Braga Ramos	Doutorado	121.794.000-63	EMBRAPA	Responsável pela ação 1.6: plantio e condução das avaliações agronômicas de híbridos de <i>B. humidicola</i>	20
Dr <sup>a</sup> . Cacilda Borges do Valle	Doutorado	754.853.708-53	EMBRAPA	Coordenação da Rede; coordenação do projeto e responsável pelas ações: 1.2, 1.4, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4; plantio de experimentos, avaliações agronômicas, cruzamentos controlados, dispersão de sementes, dispersão de pólen. Orientadora do mestrando Bruno Paniago e co-orientadora de Simony Mendonça.	60
Dr. Luís Carlos Vinhas Ítavo	Doutorado	128.276.138-24	UCDB	Colaborador no sub-projetos 1 e 2: ações 1.2, 1.4, 2.2 e 2.3 – avaliação de fatores de valor nutritivo nos híbridos de <i>B. humidicola</i> e <i>B. decumbens</i>	12
Dr. Sergio Raposo de Medeiros	Doutorado	118.164.118-76	EMBRAPA	Colaborador no sub-projetos 1 e 2: ações 1.2, 1.4, 2.2 e 2.3. Avaliação de fatores de valor nutritivo nos híbridos de <i>B. humidicola</i> e <i>B. decumbens</i>	20
Dr. Celso Dornelas Fernandes	Doutorado	453.918.316-87	EMBRAPA	Colaboração nas ações 1.2, 1.4, 1.6. Levantamento de doenças nas progênies de <i>B. humidicola</i> e <i>B. decumbens</i>	10
Dr <sup>a</sup> . Beatriz Lempp	Doutorado	434.171.676-04	UFGD	Colaboradora na ação 1.2, e 1.4. Anatomia de folhas de híbridos de <i>B. decumbens</i>	20
Dr <sup>a</sup> . Rosangela Maria Simeão Resende	Doutorado	631 410 786-53	EMBRAPA	Responsável pela ações 1.1 e 1.3. Condução dos experimentos de cruzamento a campo entre plantas sexuais, e no bloco de apomíticas; análises estatísticas dos experimentos do projeto.	20
Dr <sup>a</sup> . Jaqueline Rosemeire Verzignassi	Doutorado	080.351.768-89	EMBRAPA	Colaboradora na ação 1.2, e 1.4. Levantamento da produção de sementes nessas ações e avaliação da qualidade de	10



				sementes	
Dr. Manuel Claudio Motta Macedo	Doutorado	618.722.298-91	EMBRAPA	Coordenação do sub-projeto 2. Acompanhamento da fertilidade dos solos e das condições meteorológicas do experimento de fluxo gênico.	10
Dr <sup>a</sup> . Liana Jank	Doutorado	031.120.498-88	EMBRAPA	Colaboradora nas ações 1.1, 1.2, 1.4, e 1.6. Apoio nos ensaios de cruzamentos a campo e nas análises estatísticas	10
Dr <sup>a</sup> . Maria Suely Pagliarini	Doutorado	173 484 719-00	UEM	Responsável pela ação 1.5 e colaboradora na ação 2.3. Análises citológicas e citogenéticas dos híbridos de <i>B. humidicola</i> e <i>B. decumbens</i>	20
Dr. Marcelo Ayres Carvalho	Doutorado	329.980.581-91	EMBRAPA	Colaborador nas ações 1.4 e 1.6. Apoio ao plantio e condução das avaliações agrônomicas de híbridos de <i>B. humidicola</i>	10
Dr <sup>a</sup> . Giselle Mariano Lessa de Assis	Doutorado	028.152.317-78	CPAF-ACRE	Colaboradora na ação 1.6. Plantio e condução das avaliações agrônomicas de híbridos de <i>B. humidicola</i> .	20
Dr. José Raul Valério	Doutorado	220 984 026-00	EMBRAPA	Colaboração nas ações 1.2, 1.4, 1.6. Levantamento de pragas nas progênes de <i>B. humidicola</i> e <i>B. decumbens</i>	20
Dr <sup>a</sup> . Letícia Jungmann Cançado	Doutorado	809 882 961-87	EMBRAPA	Responsável pela ação 2.4 e colaboradora na 2.1, 2.2, 2.3. Avaliação molecular das progênes para determinação do fluxo gênico. Apoio no estudo de dispersão de pólen e de sementes- co-orientadora do mestrando Bruno Paniago	60
Dr <sup>a</sup> . Lucimara Chiari	Doutorado	174 020 388-74	EMBRAPA	Colaboradora na ações 1.2, 1.4, e 2.4- apoio às análises moleculares para identificação de híbridos de <i>B. humidicola</i> e <i>B. decumbens</i> e ao projeto de fluxo gênico.	40
Dr. José Francisco Montenegro Valls	Doutorado	008 843 240-87	EMBRAPA	Colaborador nas ações 2.2, 2.3 realizando coleta de braquiárias nativas para determinação do modo de reprodução e número de cromossomos	30

**14. Indicação de colaborações ou parcerias já estabelecidas com outros centros de pesquisa na área, incluindo contrapartida das instituições participantes;**

As instituições envolvidas neste projeto, com exceção da Universidade Católica Dom Bosco, vêm realizando trabalhos em conjunto há quase uma década e associadas a várias outras instituições que compõem essa Rede, foram responsáveis pela liberação de cultivares que respondem por mais de 80% do que é plantado nas pastagens do Brasil para a produção de bovinos. No âmbito desse programa já foram liberadas a cv. Xaraés, a cv. BRS Piatã (cultivar protegida) e em 2011 será liberada a cv. BRS Tupi (cultivar protegida).

Além das instituições participantes dessa proposta, o programa de melhoramento genético de *Brachiaria* tem projetos aprovados pelo CNPq (Edital MCT/CNPq N<sup>o</sup> 14/2009 – Universal e EDITAL MCT/CNPq/CT-Agronegócio N<sup>o</sup> 29/2008 - Apoio à expansão e consolidação dos programas de melhoramento genético convencional de plantas), além de aporte de recursos do convênio Embrapa/UNIPASTO, visando a liberação de cultivares forrageiras.

Outros centros de pesquisa que colaboram com o programa são a CEPLAC/CEPEC na Bahia, a Universidade Estadual de Campinas, a Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP-Botucatu), a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e no âmbito internacional o Victorian AgriBiosciences Centre (VABC) no projeto “*Molecular Breeding of Pasture Plants for Climate Change Adaptation and Mitigation*”, com o propósito de modificar a *Brachiaria brizantha* cv. Marandu para menores teores de lignina por silenciamento de genes.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) é outra parceira do programa de melhoramento com a participação do mestrando Ulisses Figueiredo sob orientação de Cacilda Borges do Valle, e do professor Dr. José Airton Rodrigues Nunes, no estudo de herdabilidade de características de valor nutritivo em progênie de *B. humidicola*.

O melhoramento de forrageiras tropicais é uma atividade relativamente recente e ainda pouco prestigiada nas universidades brasileiras. Através desse projeto pretende-se estimular a participação de novos alunos de pós-graduação nas universidades envolvidas a fim de aumentar os profissionais nessa área ainda tão deficiente no Brasil, que é o único país tropical realizando melhoramento genético de forrageiras.

**15. Estimativa dos recursos financeiros de outras fontes que serão aportados por eventuais parceiros;**

Recursos financeiros de outras fontes poderão ser aportados pela UNIPASTO, cujo plano anual de trabalho e negociado ano a ano com a diretoria executiva da Associação de Produtores de Sementes e em algumas atividades, poderão ser complementados por projeto submetido ao Macroprograma 2 da Embrapa para 2011-2014.

**16. indicação do grau de interesse e comprometimento de agentes dos setores público e privado ou de organizações sociais com o escopo da proposta, quando for o caso;**

Conforme já mencionado na identificação do problema, existe uma forte demanda por novas cultivares que são prontamente absorvidas pelos produtores, devido a carência de opções no mercado. A parceria com o setor privado sementeiro facilita enormemente a transferência tecnológica das cultivares, pois ao comercializarem as sementes levam também as recomendações de cultivo e uso repassadas aos parceiros da UNIPASTO em workshops anuais e discussões de Planos de marketing. Com as perspectivas de iniciarem os trabalhos com plantas transformadas será particularmente importante conhecer as

demandas e as reações dos produtores frente a essas novas tecnologias bem como integrá-los ao processo de avaliações desde o início para maior facilidade de absorção da cultivar.

O grau de interesse e total comprometimento dos parceiros neste projeto são evidentes e mediante a consolidação dessa rede, agora agregando a UCDB e a UNESP-Botucatu deverá estimular novas parcerias para projetos futuros.

## 17. Outras considerações

Na Embrapa Gado de Corte em Campo Grande, MS, encontra-se o banco de germoplasma de *Brachiaria* no Brasil, com uma coleção de 446 acessos apomíticos e sexuais, com dinâmico programa de seleção e melhoramento genético de *Brachiaria*. Conta ainda com a maior equipe trabalhando no desenvolvimento de novas cultivares de forrageiras, não apenas de *Brachiaria* mas também de *Panicum* e *Stylosanthes*, entre os centros de pesquisa da Embrapa. A equipe de pastagens da Embrapa, reunindo colegas da Embrapa Cerrados, Embrapa Pecuária Sudeste, Embrapa Gado de Leite, Embrapa Acre, Embrapa Amazônia Oriental, além da Embrapa Gado de Corte, tem notoriedade nacional e internacional, com ampla participação como palestrantes em sessões plenárias de congressos nacionais e internacionais - Reuniões Anuais da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Proceedings of the International Grassland Congress, 1989, 1993, 1997, 2001, 2005, 2008, participando ativamente na formação de recursos humanos nas principais escolas de agronomia, zootecnia e veterinária do Brasil. O grupo participou em projeto colaborativo com a União Européia, participa do projeto internacional com a Austrália, prestou consultoria em projetos internacionais (CIAT, 1988 a 1991), bem como participou em reuniões lideradas pela FAO e IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) no que tange a conservação e utilização dessas forrageiras.

Ademais, a experiência dos pesquisadores na área resultou na obra escrita sobre *Brachiaria*: “*Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*” (J.W. MILES, B.L. MAASS e C. B. DO VALLE (Eds), 1998), versões em inglês e espanhol, com participação de seis colegas da equipe de pastagens; vários capítulos de livros, entre eles o primeiro sobre “Melhoramento de Forrageiras Tropicais” (Rosângela Resende, Cacilda B. do Valle e Liana Jank, (Org.). 2008); e outro “Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*” (VALLE; PAGLIARINI, 2009) publicado pela CRC Press além de artigos em periódicos nacionais e internacionais sobre citogenética, modo de reprodução, características agrônômicas, valor nutricional, desempenho animal em pastejo, resistência a cigarrinha-das-pastagens; ocorrência de doenças em sementes; apresentação de resultados em eventos nacionais e internacionais; liderança de um projeto em cooperação com a União Européia entre 1994-1997 no estudo da apomixia em *Brachiaria*.

É, portanto oportuno consolidar-se essa rede de trabalhos visando o desenvolvimento de forrageiras no Centro-Oeste, com reflexos na produção animal de todo o Brasil e da América Tropical que depende totalmente das cultivares geradas no Brasil por não possuírem o know-how ou o clima e tecnologia para produzir sementes forrageiras. Com isso espera-se promover a integração das universidades, Embrapa e o setor privado, tornando efetiva a colaboração e potencializando os esforços para a geração de novas cultivares.

## 18. Referências Bibliográficas

---

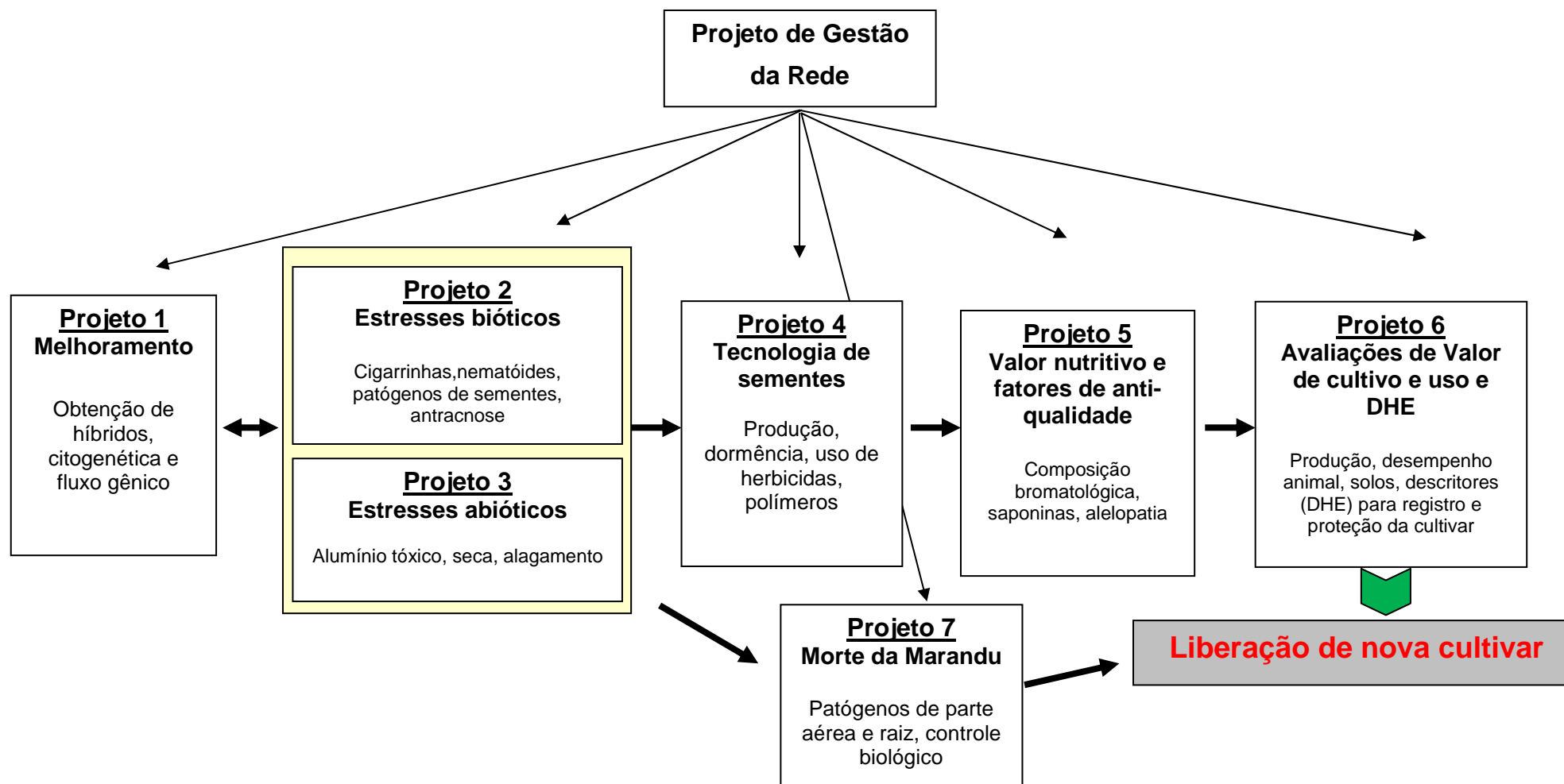
ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne.  
[http://www.abiec.com.br/download/stat\\_mercadomundial.pdf](http://www.abiec.com.br/download/stat_mercadomundial.pdf) acessado em 08/11/2010.

- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analyses. v.1, 15th edition, p; 72-74, 1990. ARTECA, R.N. **Plant growth substances: Principles and applications**. New York. Chapman E Hall, 1996. 332p.
- BOLDRINI, K R; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. DO. Meiotic behavior of a nonaploid accession endorses  $x = 6$  for *Brachiaria humidicola*. Genetics and Molecular Research. v.8, p.1444 - 1450, 2009.
- CHIARI, L.; ROCHA, M. DA; VALLE, C.B. DO; SALGADO, L.R. Variabilidade genética em acessos e cultivares de quatro espécies de *Brachiaria* estimada por marcadores RAPD. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento no. 24. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 2008
- CHIARI, L.; SALGADO, L.R.; VALLE, C.B. DO; JUNGSMANN, L.; VALLE JV DO, LEGUIZAMON, G.O.C. Estimativa da variabilidade genética em acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando marcadores RAPD. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento no. 22. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 2007.
- CORDEIRO, C.M.; TAYLOR, G.O.; HENRY, R.J. Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species. **Plant Science**, v. 155, p. 161-168. 2000.
- DAYKIN, M.E; HUSSEY, R.S. Staining and histopathological techniques in nematology. BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. (Eds.) **An advance treatise on Meloidogyne**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p.39-48.
- DIAS FILHO, M. B. Opções forrageiras para áreas sujeitas a inundação ou alagamento temporário. In: PEDREIRA, C.G.S.; MOURA, J.C. de; DA SILVA, S.C.; FARIA, V.P. de. (Org.). **Teoria e prática da produção animal em pastagens**. Piracicaba, 2005, p. 71-93.
- DIAS-FILHO, M.B. Tolerance to flooding in five *Brachiaria brizantha* accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4. p.439-447. 2002.
- EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M.; VALLE, C. B. DO; DIFANTE, G. S.; BARBOSA, R. A.; CACERE, E. R. Qualidade nutricional da forragem e produção animal em pastagens de *Brachiaria brizantha*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.44, p.15 - 23, 2009.
- EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; VALLE, C.B. do; BARBOSA, R.A.; GONÇALVES, W.V. Produção de forragem e características da estrutura do dossel de cultivares de *Brachiaria brizantha* sob pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.12, p.1805-1812, 2008
- EUCLIDES, V.P.B.; VALLE, C.B.do; MACEDO, M.C.M.; ALMEIDA, R.G.; MONTAGNER, D.B.; BARBOSA, R.A. Brazilian scientific progress in pasture research during the first decade of XXI century. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.151-168, 2010 (supl. Especial).
- FERREIRA M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. 1998.
- FIGUEIREDO, U. J. DE; NUNES, J. A. R.; VALLE, C. B. DO. Estimativas de parâmetros genéticos de propriedades físicas de híbridos intraespecíficos de *Brachiaria humidicola*. IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47. Salvador. Anais..., SBZ, Salvador. I CD-ROM, 2010.
- GARLAND, S.H.; LEWIN, L.; ABEDINIA, M.; HENRY, R.; BLAKENEY A. The use of microsatellite polymorphisms for the identification of Australian breeding of rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica** 108:53-63. 1999.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analyses, apparatus, reagents, procedures and some applications (Agricultural Handbook, 279) Washington, DC: USDA, 1970.

- HAGQUIST, C.W. Preparation and care of microscope slides. **American Biology Teacher**, v.36, n.2, p. 414-417, 1974.
- HERRERO, M.; VALLE, C. B. ; HUGHES, N.R.G.; SABATEL, V.de O.; JESSOP, N.S. Measurements of physical strength and their relationship to the chemical composition of four species of *Brachiaria*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 2, p.149-158. 2001.
- HERRERO, M; JESSOP, N.S. Relationship between In vitro gas production and neutral detergent fibre disappearance in three tropical grasses. **Animal Science**, 62: 682. 1996.
- HERRERO, M; MURRAY, I.; FAWCETT, R.H.; DENT, J.B. Prediction of the in vitro gas production and chemical composition of kikuyu grass by near-infrared reflectance spectroscopy. **Animal Feed Science Technology**. 60:51-67. 1996.
- HUGHES N. R.G.; VALLE, C. B. do; SABATEL, V. de O.; BOOCK, J.; JESSOP, N. S.; HERRERO M. Shearing strength as an additional selection criteria for quality in *Brachiaria* ecotypes. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.135, p.123-130. 2000.
- IBGE, 2006 – Censo Agropecuário. Em Comunicação Social , 21 de dezembro de 2007. [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_impressao.php?id\\_noticia=1064](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1064) consultado em 05/11/2010
- JUNGMANN, L. Caracterização da diversidade genética molecular em germoplasma de *Brachiaria* spp. **Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 2009
- JUNGMANN, L.; SOUSA, A. C. B.; PAIVA, J.; FRANCISCO, P. M.; VIGNA, B. B. Z.; DO VALLE, C.B.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stap. **Conservation Genetics** 10:1873-1876, 2009a.
- JUNGMANN, L.; VIGNA, B. B. Z.; PAIVA, J.; SOUSA, A. C. B.; DO VALLE, C. B.; LABORDA, P. R.; ZUCCHI, M. I.; SOUZA, A. P. Development of microsatellite markers for *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. **Conservation Genetics Resources**. v.1, p.475 - 479, 2009b.
- LEMPP, B; VALLE, C. B.do; MORAIS, M das G; BORGES, R A; DETMANN, E. Physical Impediment towards digestive breakdown in leaf blades os *Brachiaria brizantha*. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 20, 2005, Dublin. **Proceedings...Offered papers**. Wageningen Academic Publishers, 2005. p. 233.
- MACEDO, M.C.M. Pastagens no ecossistema cerrados. p. 28-62. In A. de O. Barcellos et al. (ed.) SIMPÓSIO SOBRE PASTAGENS NOS ECOSSISTEMAS BRASILEIROS: PESQUISAS PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, Brasília, DF, Brasil. 17-21 July 1995. SBZ, Brasília, DF, Brasil. 1995.
- MARTEN, G.C.; SHENK, J.S.; BARTON, F.E. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS), analysis of forage quality. Washington: USDA, ARS, 1985. 110 p. (Agriculture Handbook, 643).
- MCCOUCH, S.R.; CHEN, X.L.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y.G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, v. 35, n. 1-2, p. 89-99. 1997.
- MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M.S.; FORLI, F.; VALLE, C.B.do; PENTEADO, M.I.de O. Chromosome number and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica**, v.125, n.3, p.419-425. 2002.
- MOORE, J.E.; MOTT, G.O. Recovery of residual organic matter from in vitro digestion of forages. **Dairy Science**, 57: 1258-1259, 1974.

- NINAMANGO-CÁRDENAS, F.E.; GUIMARÃES, C.T.; MARTINS, P.R.; PARENTONI, S.N.; CARNEIRO, N.P.; LOPES, M.A.; MORO, J.R.; PAIVA, E.) Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. **Euphytica**, v.130, p. 223-232. 2003.
- PAGLIARINI, M S; VALLE, C. B. do; MENDES-BONATO, A B; RISSO-PASCOTTO, C. Meiotic arrest compromises pollen fertility in an interspecific hybrid between *B. ruziziensis* x *B. decumbens* (Gramineae). In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 20, 2005, Dublin. **Proceedings...Offered papers**. Wageningen Academic Publishers, 2005. p. 101.
- PEREIRA, A. V.; SOBRINHO, F. de S.; VALLE, C. B. do; LEDO, F. J. da S.; BOTREL, M. de A.; OLIVEIRA, J .S. E; XAVIER, D F. Selection of interspecific *Brachiaria* hybrids to intensify milk production on pastures. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 99-104, 2005.
- PEREIRA, A.V.; VALLE, C.B.DO; FERREIRA, R.DE.P.; MILES, J.W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: **Recursos Genéticos E Melhoramento - Plantas**. Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S de; Inglis-Valadares, M.C.; (eds). Fundação MT, Rondonópolis. p. 549-601. 2001.
- PEREIRA, J. M.; REZENDE, C. de P.; EUCLIDES, V. P. B.; VALLE, C. B. do; BORGES, A. M. F. Avaliação de novos acessos de *Brachiaria brizantha* no sul da Bahia. 1. produção animal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA,41. FORR 270, 2004, Campo Grande. **Anais...** CD-ROM. SBZ-Unipress Disc Records-V2-comunicação, 2004.
- RESENDE, M. D. V. de. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2002a. 975p.
- RESENDE, M. D. V. de. **Software SELEGEN – REML/BLUP**. Colombo: Embrapa Florestas, 2002b. 65 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 77).
- RESENDE, R. M. S; VALLE, C.B.; BONATO, A.L.V.; JANK, L; CALIXTO, S.; CARVALHO, J. Estimação de parâmetros genéticos e predição de valores genotípicos de cruzamentos interespecíficos em *Brachiaria*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., Anais... 2002, Recife, SBZ. 2002. 1CD-ROM. Forragicultura.
- RISSOPASCOTTO, C ; PAGLIARINI, M. S. ; VALLE, C. B. DO. Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf (Poaceae: Paniceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 5, p. 837-845, 2006a.
- RISSO-PASCOTTO, C; PAGLIARINI, M S; VALLE, C. B. do. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 7-10, 2006b.
- SANTOS FILHO, L.S. Seed production: perspectives from the Brazilian private sector In: **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Miles, J.W., Maass. B.L. e Valle, C.B.do (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA . CIAT Publication Nº 259. p.141-146, 1996.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT. **User's guide statistics**, versão 6, 4. ed., Cary, USA: 1996, v. 1,2.
- SHAROPOVA N, MCMULLEN MD, SCHULTZ L, SCHROEDER S, SANCHEZ-VILLEDA H, GARDINER J, BERGSTROM D, HOUCHINS K, MELIA-HANCOCK S, MUSKET T, DURU N, POLACCO M, EDWARDS K, RUFF T, REGISTER JC, BROUWER C, THOMPSON R, VELASCO R, CHIN E, MICHAEL L, WOODMAN-CLIKEMAN W, LONG MJ, LISCUM E, CONE K, DAVIS G, COE JR EH. Development and mapping of SSR markers for maize. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 463-481. 2002.
- SIMÃO NETO, M.; DIAS FILHO, M.B. Pastagens no Ecossistema do Trópico Úmido: Pesquisa para o desenvolvimento sustentável. In: SIMPÓSIO SOBRE PASTAGENS

- NOS ECOSISTEMAS BRASILEIROS: pesquisa para o desenvolvimento sustentável. 1995, Brasília, **Anais...**Brasília: SBZ, 1995.p.76-93.
- SIMIONI, C.; VALLE, C. B. DO. Chromosome duplication in *Brachiaria* (A.Rich.) Stapf allows intraspecific crosses. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. v.9, p.328 - 334, 2009.
- SOUZA JUNIOR, C.L. Reciprocal recurrent selection with half-sib progenies obtained alternately from noninbred ( $S_0$ ) and inbred ( $S_1$ ) plants in maize. **Maydica**, n.32, p.19–31, 1987.
- THEUNISSEN, J.D. An improved method for studying grass leaf epidermis. **Stain Technology**, v.64, n.5, p.239-242, 1989.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v.18, p.104-111, 1963.
- VALÉRIO, J.R.; VALLE, C.B. do; SOUZA, A.P. de; OLIVEIRA, M.C.M. Screening *Brachiaria* introductions for resistance to spittlebugs (Homoptera: Cercopidae). In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19, 2001, **Anais...** São Pedro: FEALQ. 2001. CD-ROM. ID#05-04.
- VALLE, C.B., SIMIONI, C., RESENDE, R.M.S., JANK, L. Melhoria genética de *Brachiaria*. In: Melhoria Genética de Forrageiras Tropicais. Resende et al., eds. Embrapa Gado de Corte pp.13-53. 2008.
- VALLE C.B. de; EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; VALÉRIO, J.R.; CALIXTO, S. Selecting new *Brachiaria* for Brazilian pastures. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19, 2001, ANAIS... São Pedro: FEALQ. 2001. CD-ROM. ID#13-14.
- VALLE, C. B. DO; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. *Revista Ceres*. v.56, p.460 - 472, 2009.
- VALLE, C. B. DO; MACEDO, M. C. M.; EUCLIDES, V. P. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. Gênero *Brachiaria* In: Plantas Forrageiras ed. Viçosa: Editora UFV, 2010, p. 30-77.
- VALLE, C.B. de; MILES, J.W. Breeding of apomictic species. **Apomixis Newsletter**, v. 5, p. 37-47. 1992.
- VALLE C.B., PAGLIARINI M.S. Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*. In: Singh R. J. (ed) Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. CRC Press. Boca Raton, pp. 103-151. 2009.
- VALLE, C.B. de; SAVIDAN, Y.H. Genetics, Cytogenetics, and Reproductive Biology of *Brachiaria*. In: **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Miles, J.W., Maass. B.L. e Valle, C.B.do (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. CIAT Publication Nº 259. p-147-163. 1996.
- WILSON, D. Nutritive value and the genetic relationships of cellulose content and leaf tensile strength in *Lolium*. **Journal of Agricultural Science**, v. 65, n. 2, p. 285-292, 1965.
- YOUNG, B.A.; SHERWOOD, R.T.; BASHAW, E.C. Cleared-pistyl and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. **Canadian Journal of Botany** 57:1668-1672. 1979.
- ZORZATTO, C.; CHIARI, L.; BITENCOURT, G. DE A.; DO VALLE, C. B.; LEGUIZAMÓN, G. O. DE C.; SCHUSTER, I.; PAGLIARINI, M. S. Identification of a molecular marker linked to apomixis in (*Poaceae*). *Plant Breeding*, 2010. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2010.01763.x



**Figura 1: Integração entre os Projetos da Rede “CULTIFOR”: “Desenvolvimento de cultivares de forrageiras nativas e exóticas: mudanças climáticas e produção sustentável de proteína animal”**



## Plano de Gestão da Rede

### a) Título da Rede de Pesquisa

*Desenvolvimento de cultivares de forrageiras nativas e exóticas: mudanças climáticas e produção sustentável de proteína animal*

b) **Coordenador da Rede:** Cacilda Borges do Valle

### c) Objetivos da formação da Rede de Pesquisa

#### Objetivo Geral:

Essa rede visa integrar de forma efetiva e conseqüente as várias instituições envolvidas em atividades de geração de novas cultivares de forrageiras nativas e exóticas com vistas a diversificar as pastagens visando a produção sustentável de proteína animal. Visa ainda fortalecer e consolidar programas de pós-graduação em agronomia, zootecnia e biologia na região Centro-Oeste do Brasil.

#### Objetivos específicos:

- Oferecer novas opções de *Brachiaria* para pastagens pela geração e seleção de genótipos candidatos a novas cultivares. Visa principalmente determinar o fluxo gênico em *B. brizantha* a fim de estabelecer padrões de biossegurança para futuros ensaios de campo com plantas transformadas.
- Selecionar genótipos de gramíneas e leguminosas forrageiras resistentes a estresses bióticos, determinando a etiologia de doenças, avaliando resistência a insetos-praga, usando técnicas de biologia avançada (pirosequenciamento massal e sequências diferencialmente expressas, construir mapa de QRL) na busca de genes de resistência, e estabelecendo estratégias de controle biológico.
- Fenotipar gramíneas e/ou leguminosas forrageiras tropicais divergentes quanto à tolerância ao alumínio, à eficiência de uso aos nutrientes: Ca, Mg e P, ao alagamento e ao déficit hídrico, identificando os genótipos mais contrastantes para a obtenção de populações segregantes a fim de dinamizar os programas de melhoramento.
- Identificar e/ou validar genes relacionados à tolerância ao alumínio em *Brachiaria decumbens*, e contribuir para consolidar o uso de técnicas e estratégias avançadas de biologia molecular no dia-a-dia dos programas de melhoramento, para a seleção assistida.
- Gerar conhecimentos e tecnologias para definir estratégias de manejo visando a produtividade e a qualidade fisiológica das sementes forrageiras, tais como corte seguido de adubações, uso de herbicidas no controle de invasoras, quantificando o

efeito dos fatores genéticos e ambientais. Visa ainda desenvolver método para superação de dormência nas sementes e desenvolver polímeros para revestir sementes e assegurar bom estabelecimento da pastagem.

- Avaliar valor nutricional e identificar e quantificar aspectos de anti-qualidade de forrageiras nativas e exóticas em genótipos promissores dos gêneros *Brachiaria*, *Panicum* e *Stylosanthes*, com potencial para maximizar a produção de proteína animal em sistemas de produção baseada em pastagens nos biomas do Cerrado e Pantanal como alternativas sustentáveis de sistemas de produção de proteína animal.
- Determinar o valor agrônômico de acessos e híbridos de forrageiras sob cortes e pastejo e com base nos resultados, selecionar o(s) melhor(es) para registrar como nova(s) cultivar(es) visando à diversificação das pastagens tropicais. Estabelecer os descritores morfológicos dos candidatos potenciais a fim de proceder ao registro e proteção junto ao Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento.
- Objetivo geral: Identificar os patógenos relacionados com a morte de capim-marandu presentes em raiz e parte aérea e, com isso, gerar produtos e processos capazes de reverter o quadro de mortalidade de pastos nas regiões abrangidas por este projeto.
- Potencializar a interação entre o ensino, pesquisa e extensão, em diferentes instituições do Centro Oeste e do país, em prol da diversificação de pastagens com sustentabilidade usando forrageiras nativas e exóticas selecionadas.
- Capacitar pessoal e formar pesquisadores competentes e capazes de incrementar o desenvolvimento científico da região Centro-Oeste.

#### **d) Projetos que estão incluídos na Rede e suas características**

**Projeto 1:** Melhoramento genético de *Brachiaria* e determinação de fluxo gênico em *Brachiaria brizantha*. **Coordenador: Cacilda Borges do Valle.** Este projeto visa gerar novos genótipos superiores candidatos a cultivares e que reúnam características de resistência a estresses bióticos e abióticos, boa produção de sementes, e com bom valor nutritivo e menor emissão de metano. A determinação de fluxo gênico objetiva preparar o caminho para avaliar eventos transgênicos (por silenciamento de genes de deposição de lignina) de *B. brizantha* visando uma menor emissão de metano.

**Projeto 2.** Desenvolvimento de estratégias sustentáveis para a sanidade de forrageiras tropicais nativas e exóticas. **Coordenador: Celso Dornelas Fernandes.** Este projeto visa estabelecer estratégias de redução de perdas de produtividade/qualidade de forrageiras tropicais devido à patógenos e pragas por meio de fontes de resistência e controle biológico.

**Projeto 3:** Estratégias de fenotipagem e biotecnologia para a caracterização de forrageiras nativas e exóticas quanto à tolerância a estresses abióticos visando à adaptação às mudanças climáticas e a solos ácidos e de baixa fertilidade. **Coordenador: Valdemir Antonio Laura.** Este projeto visa fenotipar gramíneas e leguminosas forrageiras tropicais divergentes quanto à tolerância ao alumínio, à eficiência de uso dos nutrientes: Ca, Mg e P, ao alagamento e ao déficit hídrico, identificando os genótipos mais contrastantes para produzir populações segregantes visando a busca de genes. Finalmente, visa contribuir para

consolidar o uso de técnicas e estratégias avançadas de biologia molecular no dia-a-dia dos programas de melhoramento, para que com a seleção assistida possa dinamizar os programas de melhoramento.

**Projeto 4:** Inovações tecnológicas para produção de sementes de forrageiras tropicais nativas e exóticas. **Coordenador: Jaqueline Rosemeire Verzignassi.** Este projeto reúne diferentes competências a fim de definir estratégias de manejo visando a produtividade e a qualidade fisiológica das sementes forrageiras de genótipos pré-selecionados e de cultivares em uso, seja por manejo com cortes e adubação, seja desenvolvendo polímeros ou métodos de quebra de dormência.

**Projeto 5:** Avaliação nutricional e anti-nutricional de forrageiras nativas e exóticas. **Coordenador: Luiz Carinhas Ítavo.** Este projeto caracteriza-se por avaliar a qualidade das forrageiras a fim de identificar cultivares de gramíneas com elevado potencial nutritivo que atendam as demandas dos animais e aumentem sua eficiência produtiva. Visa ainda identificar teores de fatores de anti-qualidade de cultivares já em uso e a fim de explicar fenômenos de intoxicação animal.

**Projeto 6:** Avaliação de genótipos de forrageiras tropicais para a determinação do Valor de Cultivo e Uso (VCU) e estabelecimento de critérios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) que permitam registrar a(s) nova(s) cultivar(es) junto ao Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Coordenador: Rodrigo Amorim Barbosa.** Esse projeto representa a etapa final de avaliação de genótipos promissores com vistas a liberar o(s) mais vantajoso frente às cultivares em uso. Para tanto os testes são conduzidos sob corte e outros sob pastejo a fim de atender os requisitos para registro e proteção junto ao MAPA, e com isso minimizar insucessos junto aos produtores.

**Projeto 7:** Levantamento da ocorrência, identificação e controle de patógenos associados às raízes e parte aérea de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no Mato Grosso. **Coordenador: Daniel Cassetari Neto.** Espera-se com essa linha fornecer informações com respeito à identificação e o controle de diversos agentes fitopatogênicos que possam estar causando sérios problemas na imensa área cultivada com o capim marandu.

#### **e) Como os projetos de pesquisa interagem e de que maneira os resultados de uma pesquisa complementarão a outra e, ainda, de que forma os resultados complementares atingirão o objetivo global proposto pela Rede**

Essa rede formada por pesquisadores de reconhecida experiência nas áreas componentes pretende consolidar o trabalho multidisciplinar envolvendo, agrônomos, zootecnistas, biólogos, e professores em diversas instituições do Centro-Oeste que trabalhando de forma harmônica avancem genótipos promissores que avaliados em comparação com cultivares atuais em todos os projetos possam ser liberados como novas cultivares. Assim um genótipo superior criado por cruzamentos no projeto 1, deverá ser avaliado quanto à resistência a estresses bióticos no projeto 2 e depois ou concomitantemente no projeto 3 quanto a estresses abióticos. Após a multiplicação por sementes deverão ser avaliados em ensaios sob corte e pastejo a fim de determinar-se o valor nutritivo e produção de sementes para finalmente poderem ser liberados e comercializados com um forte aporte de recomendações embasadas no desempenho animal. Como os trabalhos de seleção e melhoramento de gramíneas e leguminosas forrageiras estão em andamento a mais de uma

década já existem candidatos a cultivares para serem avaliados em todos os projetos dessa rede, enquanto novos genótipos serão criados no projeto 1.

Com a estruturação dos trabalhos sob a forma de Rede de pesquisa e pós-graduação a execução desses projetos ficará mais dinâmica e integrada, constituindo-se assim uma “linha de produção” que contribuirá para a geração de conhecimento, dados, inovação, tecnologias e formação de recursos humanos para a região Centro-Oeste.

Por intermédio de estreita comunicação, workshops e visitas pretende-se atingir o objetivo global da rede que é gerar novas cultivares para diversificação das pastagens levando em consideração o equilíbrio ambiental e a sustentabilidade ao mesmo tempo em que investe na formação de recursos humanos hoje muito deficientes nesse setor.

O envolvimento do setor privado sementeiro (UNIPASTO) seja trazendo as demandas do setor produtivo seja realizando a eficiente transferência de tecnologias ao campo é um forte estímulo ao trabalho multidisciplinar e complementar nessa rede, pois assegura a rápida adoção das cultivares dada a grande necessidade em diversificar as áreas de pastagens com elevados níveis de produção animal.

#### **f) As metas a serem atingidas, incluindo os produtos a serem gerados e as principais contribuições científicas e/ou tecnológicas da Rede**

As metas previstas nos diferentes projetos são realísticas e exeqüíveis e deverão resultar em pelo menos duas cultivares registradas e liberadas até o final do projeto.

Ao longo dos experimentos para estabelecer as recomendações de cultivo e uso, serão desenvolvidas novas metodologias de triagem, identificados novos genótipos com resistência a estresses e com valor nutritivo e produção de sementes compatíveis com os requisitos de uma nova cultivar. O avanço científico nos trabalhos com biotecnologia deverão subsidiar os programas de seleção e melhoramento contribuindo para uma mais rápida e eficiente identificação de genótipos superiores bem como permitir a busca de genes e QTLs para um futuro melhoramento assistido. As contribuições científicas e tecnológicas geradas serão divulgadas por meio de publicações, teses e dissertações, resumos e participações em congressos e similares.

#### **g) Atividades de formação de recursos humanos acadêmica e técnica**

As ações a serem desenvolvidas pelos sete projetos componentes da Rede serão executadas com a participação direta de alunos de diferentes níveis, contribuindo assim com atividades técnicas e acadêmicas de formação de recursos humanos desde apoio técnico, mestrado, doutorado e pós-doutorado. Essas atividades foram discriminadas dentro de cada projeto componente e será viabilizada pelos programas de pós-graduação na região Centro-Oeste envolvidos além de outros programas de pós-graduação parceiros em outras regiões geográficas no Brasil

#### **h) Estratégias de divulgação científica/educação ambiental, de modo adequado ao público beneficiário, com envolvimento de equipe interdisciplinar desde o início da pesquisa**

A apropriação dos resultados obtidos pela presente proposta será negociada entre as Instituições parceiras e integrantes da Rede CULTIFOR e o CNPq. Os pesquisadores envolvidos no projeto participarão dos produtos gerados (publicações, patentes, processo e produtos) de acordo com a intensidade de envolvimento no trabalho relacionado. A inclusão do nome do pesquisador na equipe do projeto não assegura a co-autoria em trabalhos publicados e/ou possíveis patentes geradas, para isso, será levado em consideração o grau de envolvimento do pesquisador na execução das atividades previstas.

Na ocorrência de resultados passíveis de proteção intelectual, a divulgação de qualquer dado só ocorrerá após sua proteção por depósito de patente. Portanto, esta será registrada, segundo as normas do CNPq e a legislação vigente no país sobre propriedade intelectual ([www.mct.gov.br/legis/prop\\_intelec.htm](http://www.mct.gov.br/legis/prop_intelec.htm)), junto ao INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual).

A transferência de tecnologias geradas será realizada por meio da negociação e licenciamento do direito de produção ou comercialização junto a empresas de interesse. Esses direitos serão definidos pelas parceiros envolvidos na Rede proposta.

Os resultados e os conhecimentos gerados por esta proposta serão difundidos em dias de campo, eventos científicos, bem como em simpósios e similares. Serão escritos artigos técnicos para revistas informativas de agropecuária e publicações de conselhos de classe e outras correlatas. Serão geradas publicações para revistas científicas indexadas com corpo editorial de alto impacto científico e tecnológico.

**i) Orçamento consolidado de gastos totais da Rede de Pesquisa (além do orçamento consolidado dos projetos de pesquisa da Rede, incluir previsão de gastos para o funcionamento da Rede, tais como organização de reuniões internas de integração e, ainda, previsão de recursos em diárias e passagens para participação em reuniões de acompanhamento e avaliação anuais da Rede PRO-CENTRO-OESTE);**

**(Vide quadros ao final do projeto)**

**j) Previsão e regularidade de reuniões anuais internas de acompanhamento e integração dos projetos da Rede**

A Rede CULTIFOR contará com o Grupo Gestor composto pelos coordenadores de cada projeto e por vice-coordenadores por eles indicados.

A Rede CULTIFOR será gerenciada de forma integrada e articulada entre os projetos componentes e seus respectivos coordenadores. Para tanto serão realizadas reuniões anuais de acompanhamento de cada projeto conduzida pelo coordenador do projeto com participação do Grupo Gestor da Rede, seminários anuais de avaliação da rede conduzida pelo Coordenador e pelo Grupo Gestor da Rede, e visitas técnicas *in loco* realizadas pelo grupo gestor da rede.

**k) Indicadores de sustentabilidade da proposta, mecanismos de monitoramento de impactos ambientais e sociais no contexto do desenvolvimento em larga escala do projeto**

**Impactos científicos e tecnológicos**

- Liberação de novas cultivares que impactam diretamente os sistemas de produção na região Centro-Oeste

**Impactos sociais**

- Contribuir para o incremento da oferta de proteína animal (carne, leite e derivados) da região Centro-Oeste e no Brasil;
- Contribuir para a qualidade de vida da população pela oferta de alimentos de origem animal certificados e com qualidade superior;
- Promover o aumento da geração de empregos nas cadeias produtivas animal;

### Impactos ambientais

- Contribuir para a redução do uso de pesticidas, e outras substâncias nocivas ao meio ambiente;
- Contribuir para a redução pela pecuária da emissão de gases de efeito estufa pela otimização e incremento da produtividade pecuária;
- Contribuir para a redução do uso de insumos para a produção de proteína animal e derivados;
- Garantir a não imposição de barreiras ambientais e correlatas aos produtos brasileiros de origem animal (bovino, ovino e caprino);

### Impactos econômicos

- Contribuir para o incremento da produção pecuária da região Centro-Oeste do Brasil;
- Contribuir para o incremento de renda do produtor rural e dos atores envolvidos nas cadeias produtivas pecuárias na região Centro-Oeste;
- Contribuir para o aumento da exportação de produtos de origem animal de alta qualidade, seguros e certificados; e
- Aumentar a participação da cadeia produtiva animal na arrecadação de divisas para a região Centro-Oeste e para o País.

### I) Outras considerações

A produção de bovinos de corte no Brasil tropical é baseada no uso de pastagens, com predominância de poucas cultivares de forrageiras. Apesar da liberação de novas cultivares na última década ainda predomina o monocultivo de gramíneas no Brasil pecuário cobrindo milhões de hectares. Esta baixa diversidade genética gera grande vulnerabilidade nos sistemas de produção causando problemas tais como a expansão de pragas que causou a dizimação de *B. decumbens* por cigarrinhas-das-pastagens na década de 70-80 na Amazônia e mais recentemente a síndrome da morte de *B. brizantha* cv. Marandu na Amazônia legal e de forma mais geral, a degradação de pastagens, particularmente no Centro-Oeste. Portanto, o objetivo principal desta REDE é obter novas cultivares selecionando entre acessos e híbridos de diferentes espécies e gêneros, nativos e exóticos, comprovadamente importantes para a produção animal, a fim de diversificar as pastagens tropicais com genótipos que reúnam bom desempenho animal e resistência a estresses bióticos e abióticos com boa produção de sementes. A REDE será composta por seis Projetos e a gestão da Rede será compartilhada com um grupo gestor constituído pelos responsáveis por cada Projeto. O objetivo dessa gestão é assegurar o cumprimento do cronograma e contornar eventuais problemas de execução bem como auxiliar nos possíveis entraves na condução das atividades. Está prevista a organização de pelo menos um workshop de discussão de resultados dos projetos componentes a partir do segundo ano de condução da Rede. O Projeto 1 aborda as atividades de melhoramento a fim de gerar as populações melhoradas e segregantes para genes de interesse visando identificar genótipos candidatos a cultivares a serem incorporados aos projetos seguintes como ilustrado na Figura 1. e ainda visa estudar o fluxo gênico em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em preparação para estudos com plantas transformadas para menor teor de lignina como análises de citogenética, caracterização molecular da diversidade de duas das espécies mais importantes usando microssatélites que não foi finalizada no projeto anterior, e um estudo de fluxo gênico da *B. brizantha* cv. Marandu, prevendo trabalhos com cultivar geneticamente modificada em futuro próximo. A obtenção de faz parte do PA 3. Nele serão geradas e avaliadas progênies resultantes de hibridação intra e interespecífica com seleção

de híbridos e genitores por meio de ensaios conduzidos em diferentes ambientes. O PA 4 incluirá os ensaios de apoio visando reunir as informações necessárias para registro e proteção de cultivares (DHE e VCU corte e pastejo) bem como para recomendações de uso, como a determinação de resistência a estresses bióticos e abióticos, em condições controladas e em parcelas no campo. Finalmente, a determinação do desempenho animal será abordada no PA 5 conduzindo-se ensaios em pastejo em pelo menos um local por bioma visando liberação da cultivar com as informações requeridas para determinar o Valor de Cultivo e Uso (VCU). Estas atividades darão seqüência às que já resultaram na liberação da cv. Xaraés, registro, proteção das cvs. BRS Piatã, em 2007 e da *B. humidicola* BRS Tupi em 2009, com previsão de liberação de pelo menos mais duas novas cultivares até o final do projeto. As atividades serão conduzidas por uma grande equipe e uma rede de instituições (Embrapa, institutos estaduais e universidades) e contará com o apoio da UNIPASTO, assegurando a transferência das recomendações e perfeita integração com o setor produtivo.

O lançamento de uma cultivar é um processo longo e criterioso conforme discutido por VALLE et al. (2010). O uso de um conjunto de metodologias e estratégias, e principalmente, uma equipe engajada é essencial para que ao final, novas cultivares venham a corresponder à grande demanda por sustentabilidade e produtividade dentro da pecuária nacional.

### Orçamento consolidado (por Projeto e Total da Rede)

Dispêndio Financeiro	Projeto 1	Projeto 2	Projeto 3	Projeto 4	Projeto 5	Projeto 6	Projeto 7	Total Rede (R\$)
Material bibliográfico	0	5.500,00	0	2.000,00	0	0	2.500,00	10.000,00
Custeio	278.799,00	410.476,90	566.310,00	164.763,80	193.005,00	502.194,92	68.090,30	2.183.639,92
Diárias	7513,20	24.417,90	14.900,00	10.330,65	6.761,88	13.148,10	15.965,55	93.037,28
Passagens	9.500,00	15.750,00	26.200,00	14.500,00	0	20.730,84	13.500,00	100.180,84
Equipamentos e material permanente	463.755,00	190.760,00	294.800,00	63.050,00	353.350,00	37.460,00	17.950,00	1.421.125,00
Bolsas	97.200,00	252.600,00	70.560,00	108.000,00	235.984,00	149.784,00	28.800,00	942.928,00
<b>Total (R\$)</b>	<b>856.767,20</b>	<b>899.504,80</b>	<b>972.770,00</b>	<b>362.644,45</b>	<b>789.100,80</b>	<b>723.317,86</b>	<b>146.805,85</b>	<b>4.750.911,00</b>

Projeto 1: Melhoramento de *Brachiaria* e estudo de fluxo gênico em *Brachiaria brizantha*.

Projeto 2: Desenvolvimento de estratégias sustentáveis para a sanidade de forrageiras tropicais nativas e exóticas

Projeto 3: Estratégias de fenotipagem e biotecnologia para a caracterização de forrageiras nativas e exóticas quanto à tolerância a estresses abióticos visando à adaptação às mudanças climáticas e a solos ácidos e de baixa fertilidade

Projeto 4: Inovações tecnológicas para produção de sementes de forrageiras tropicais nativas e exóticas

Projeto 5: Avaliação nutricional e anti-nutricional de forrageiras nativas e exóticas

Projeto 6: Avaliação de genótipos de forrageiras tropicais para determinação do Valor de Cultivo e Uso (VCU) e estabelecimento de Distinguidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE)

Projeto 7: Levantamento da ocorrência, identificação e controle de patógenos associados às raízes e parte aérea de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em Mato Grosso



Previsão de gastos para o funcionamento da Rede CULTIFOR

DISPÊNDIO	Ano 1			Ano 2			Ano 3			TOTAL
	Semestre 1	Semestre 2	Sub-total	Semestre 1	Semestre 2	Sub-total	Semestre 1	Semestre 2	Sub-total	GERAL
<b>CUSTEIO</b>	47.523,76		47.523,76	47.523,76		47.523,76	47.523,76		47.523,76	142.571,28
Material de consumo	5.000,00		5.000,00	5.000,00		5.000,00	5.000,00		5.000,00	15.000,00
STPJ										
Passagens	24.000,00		24.000,00	24.000,00		24.000,00	24.000,00		24.000,00	72.000,00
Diárias	13.523,76		13.523,76	13.523,76		13.523,76	13.523,76		13.523,76	40.751,28
<b>CAPITAL</b>										
Total	47.523,76		47.523,76	47.523,76		47.523,76	47.523,76		47.523,76	142.571,28