

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRO-CENTRO-OESTE Nº 031/2010

Proposta de projeto

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS SUSTENTÁVEIS PARA A SANIDADE DE
FORRAGEIRAS TROPICAIS NATIVAS E EXÓTICAS**

Coordenador

Dr. Celso Dornelas Fernandes

REDE DE PESQUISA

**DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES DE FORRAGEIRAS NATIVAS E EXÓTICAS:
MUDANÇAS CLIMÁTICAS E PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE PROTEÍNA ANIMAL**

Coordenadora

Dra. Cacilda Borges do Valle

Instituição proponente

Embrapa Gado de Corte

Campo Grande, MS
Novembro de 2010

Anexo I – Modelo Estruturado de Projeto

Edital:	Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRO-CENTRO-OESTE Nº 031/2010
Coordenador/Proponente:	Celso Dornelas Fernandes
Título da Proposta:	Desenvolvimento de estratégias sustentáveis para a sanidade de forrageiras tropicais nativas e exóticas
Tipo de Proposta (Projeto de Pesquisa/Projeto de Rede):	Projeto de Pesquisa
Nome da Rede de Pesquisa:	Desenvolvimento de cultivares de forrageiras nativas e exóticas: mudanças climáticas e produção sustentável de proteína animal
Linha de Pesquisa e Tema:	<p>Linha 1: Ciência, Tecnologia e Inovação para Sustentabilidade da Região Centro-Oeste Temas: - 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). - Novas tecnologias de controle biológico/semioquímico e manejo integrado de pragas de plantas e de animais de importância regional (mosca-do-chifre, carrapato, berne, helmintos, platelmintos, mosca-da-fruta, entre outros).</p> <p>Linha 3: Desenvolvimento de Produtos, Processos e Serviços Biotecnológicos Temas: 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:	Universidade Federal de Mato Grosso, Universidade Brasília, Universidade Estadual Paulista- Campus Jaboticabal, Embrapa Cerrados e Embrapa Arroz e Feijão
Valor Total Solicitado pelo Projeto de Pesquisa (R\$):	899.504,80
Prazo de Execução:	3 anos

Projeto de Pesquisa:

a) identificação da proposta, da localidade escolhida e do tipo de projeto;

- **Identificação da proposta:** Desenvolvimento de estratégias sustentáveis para a sanidade de forrageiras tropicais nativas e exóticas
- **Localidade escolhida:** Estados da Região Centro-Oeste do Brasil
- **Tipo de Projeto:** Pesquisa aplicada

b) Identificação da Linha de Pesquisa e Tema da proposta

Linha 1: Ciência, Tecnologia e Inovação para Sustentabilidade da Região Centro-Oeste

Temas:

- 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).

Linha 3: Desenvolvimento de Produtos, Processos e Serviços Biotecnológicos

Temas: Pesquisa, desenvolvimento e inovação nas áreas de fronteira de nanotecnologia, genômica, pós-genômica, proteômica e bioinformática

c) Identificação do(s) Programa(s) de Pós-Graduação envolvido(s) na proposta, bem como dos mecanismos de integração propostos no âmbito do projeto de Rede;

A proposta de pesquisa contempla a participação direta de vários Programas de Pós-Graduação stricto sensu, com a participação de integrantes da rede, quais sejam:

- Programa de pós-graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal/Mestrado: Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Campus de Aquidauana-MS
Professor credenciado: Dr. Celso Dornelas Fernandes;

- Programa de pós-graduação em Agricultura Tropical / Mestrado e Doutorado: Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Cuiabá-MT.
Professor credenciado: Dr. Daniel Cassetari Neto

- Programa de Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular / Mestrado e Doutorado: Universidade de Brasília, Brasília-DF.
Professor credenciado: Dr. Renato de Oliveira Resende;

- Programa de Programa de Pós-graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) / Mestrado e Doutorado: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/FCAV, Campus de Jaboticabal, SP.
Professor credenciado: Dr. Jaime Maia dos Santos;

- Programa de Programa de Pós-graduação em Ciência da Computação: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus de Campo Grande, MS.
Professor credenciado: Dr. Said Sadique Adi;

- Programa de Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, mestrado e doutorado: Universidade Estadual de Campinas, SP.
Professora credenciada: Dra. Anete Pereira de Souza;

- Programa de Programa de Pós-graduação em Biotecnologia / mestrado: Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande/MS.
Professora credenciada: Dra. Rosangela Maria Simeão.

- Programa de Programa de Pós-graduação em Biotecnologia / mestrado: Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande/MS.
Professora credenciada: Dra. Cacilda Borges do Valle.

- Programa de pós-graduação em Química / Mestrado e Doutorado: Universidade de Brasília (UnB)
Pesquisadores credenciados: Dr. Carlos Bloch Junior

- Programa de pós-graduação em Biologia Animal / Mestrado e Doutorado: Universidade de Brasília (UnB)
Pesquisadores credenciados: Dr. Luciano Paulino da Silva

- Programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas / Mestrado e Doutorado: ESALQ/USP, Piracicaba – SP.
Professor credenciado: Carlos Alberto Labate

- Programa de pós-graduação em Genética e Evolução / Mestrado e Doutorado: UNICAMP, Campinas - SP.
Professor credenciado: Gonçalo Guimarães Pereira

- Programa de pós-graduação em Ciência da computação / Mestrado: UFMS, Campo Grande - MS.
Professor credenciado: Said Sadique Adi

d) qualificação do principal problema a ser abordado

Enquanto, por um lado, o Brasil aproveita a oportunidade de se apresentar ao mundo como um dos maiores produtores de carne bovina a pasto, divulgando a marca “Brazilian Beef”, de outro, convive com séria ameaça representada por riscos associados à fitossanidade de forrageiras. Sabe-se que a produção de carne no Brasil, com um rebanho de 204,5 milhões de cabeças (IBGE, 2006), é baseada quase que exclusivamente em pastagens de gramíneas e leguminosas forrageiras. Se tal fato é forte argumento na divulgação e comercialização internacional da carne bovina brasileira, é estratégico que haja esforços no sentido de se minimizar riscos atrelados ao contexto fitossanitário dessas pastagens. Na bovinocultura de corte brasileira convive-se, por exemplo, com a ameaça representada por extensas monoculturas, onde milhões de hectares estão estabelecidos com reduzido número de espécies forrageiras. Além de

vulneráveis a fatores abióticos, tais condições originam sistemas de produção reconhecidamente de alto risco, vulneráveis, por exemplo, à pragas e doenças. No presente projeto são apresentadas soluções para as mais importantes restrições bióticas, limitantes à produção de forragens nesse sistema de produção.

A importância das pastagens no sistema produtivo brasileiro pode ser constatada pela área que abrangem. No Brasil, as pastagens cultivadas ocupam aproximadamente 120 milhões de hectares (ANUALPEC, 2009) sendo que o mercado de sementes de forrageiras movimenta U\$ 250 milhões, equivalente ao mercado de milho híbrido no país (ANDRADE, 2001). Ressalta-se que ao longo das últimas três décadas a área de pastagens aumentou apenas 17%, enquanto que a produção de carne cresceu 114%. Tal fato se deve à adoção de novas tecnologias, como vacinação, melhoramento animal, mineralização do rebanho e técnicas de manejo das pastagens, mas, em especial, à utilização de novas cultivares de forrageiras. Plantas essas mais adaptadas, mais produtivas, resistentes a pragas e doenças, resultantes de lançamentos por instituições de pesquisa brasileiras.

Embora se reconheça que muitas propriedades apresentem elevados índices de produtividade, fato é que podemos e devemos melhorar ainda mais. Os índices de produção médios do Brasil são baixos. Estima-se que no Brasil, cerca de 50% das pastagens cultivadas estão degradadas ou em processo de degradação (MACEDO, 2005; DIAS-FILHO e ANDRADE, 2005; PEREIRA et al., 2005). Isso é devido, principalmente, ao uso de altas taxas de lotação animal, sem a devida reposição de nutrientes. Enquanto a grande maioria destas áreas é composta por forrageiras do gênero *Brachiaria*, principalmente *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Marandu, por serem áreas de baixa a média fertilidade de solo, em outras, com solos de média a alta fertilidade, predominam forrageiras da espécie *Panicum maximum*. Algumas cultivares dessa espécie já foram testadas e validadas para substituir a *B. brizantha* cv. Marandu em áreas acometidas pela “síndrome da morte de pastagens” (ANDRADE e VALENTIM, 2006). É necessário, portanto, avaliar, selecionar e liberar novas cultivares visando à diversificação das pastagens em áreas de pastagens degradadas. A Embrapa Gado de Corte dispõe de coleções tanto do gênero *Brachiaria* como, também, da espécie *P. maximum*, com ampla variabilidade que têm sido exploradas na busca por acessos promissores.

Adicionalmente, a consorciação de pastagens se reveste de grande importância na sustentabilidade do sistema e na diversificação dessas áreas. A leguminosa do gênero *Stylosanthes*, por exemplo, se destaca por apresentar, além de adequada produção e qualidade, adaptação a solos ácidos e de baixa fertilidade, comuns na região Centro-Oeste (Embrapa Gado de Corte, 2007). Na literatura constata-se a existência de 45 espécies descritas de *Stylosanthes*, sendo considerada a mais importante leguminosa forrageira para os ecossistemas tropicais e subtropicais. O gênero de *Stylosanthes* spp. está predominantemente distribuído nas Américas do Sul, Central e parte tropical da América do Norte, constituindo-se a América tropical no principal centro de diversidade do gênero. No Brasil, são conhecidas 25 espécies nativas dessa leguminosa, distribuídas em grande variabilidade de solo e clima, muitas das quais são bem adaptadas a solos de baixa fertilidade natural, comuns na região dos cerrados da região Centro-Oeste, onde grande parte das áreas é explorada com pastagens cultivadas (FERNANDES, 2003).

Pragas e doenças, assim como em qualquer outra cultura, restringem o potencial produtivo das plantas forrageiras. Clements e Henderson (1979) constataram que pragas, embora presentes, porém despercebidas, reduziram a produção da pastagem em 30%. Diferentemente de outras culturas, no entanto, a entomologia e fitopatologia de plantas forrageiras têm sido relegadas a um segundo plano.

No Brasil, há restrições bióticas de ocorrência frequente e generalizada como as cigarrinhas-das-pastagens, no caso de gramíneas; assim como a antracnose, na principal leguminosa forrageira (*Stylosanthes* spp.). Ressalta-se, como mencionado, os casos e relatos de morte de pastagens, em especial associados à principal gramínea forrageira na região Centro e Norte do país, a *B. brizantha* cv. Marandu. Outras pragas (ex. percevejos castanhos) e doenças (ocasionadas por fungos, vírus, nematóides), igualmente importantes e limitantes, completam a lista de agentes de importância fitossanitária em áreas de pastagens no Brasil.

Importante ressaltar que no sistema extensivo, predominante na bovinocultura de corte nacional, as pastagens são consideradas culturas de baixo valor por unidade de área. Nessas condições, o controle químico é de aplicação limitada por ser antieconômico. Aliado ao aspecto econômico há, também, limitações de ordem ecológica associado ao tratamento de extensas áreas. O sucesso na adoção de medidas visando ao controle de pragas e doenças, em pastagens, dependerá da maneira como estas medidas alterarão as práticas rotineiras no sistema de produção, ou seja, as medidas a serem recomendadas não poderão ser tais que venham intensificar o sistema de uso. As eventuais proposições deverão ser de baixo custo e de fácil adoção. Aqui reside o grande potencial da utilização de gramíneas resistentes. A busca por gramíneas alternativas para a composição de um quadro mais diversificado no contexto da exploração deve ser uma

constante. Ao se liberar no futuro, novas cultivares que além de boas características agronômicas, apresentem, também, alto nível de resistência às pragas e doenças, estar-se-á oferecendo aos produtores uma alternativa de controle barata e de fácil adoção.

A Embrapa, detentora do maior germoplasma de *Brachiaria* spp., *Panicum maximum* e *Stylosanthes* spp. no Brasil, aliada às demais instituições de pesquisa/ensino sediadas na Região Centro-Oeste e outras regiões do Brasil, têm importante papel no desenvolvimento de tecnologias e processos que possam minimizar problemas sanitários das forrageiras tropicais.

Através desse projeto serão disponibilizadas soluções sustentáveis para a redução de perdas quantitativas e/ou qualitativas de forrageiras, priorizando o emprego de medidas alternativas ao controle químico, com ênfase na resistência de plantas forrageiras a patógenos e insetos-praga; valorizando ainda mais a marca “Brazilian Beef”.

Estado da Arte

A cada ano, o agronegócio brasileiro vem consolidando sua posição na economia devido ao avanço tecnológico, ao incremento na produtividade e à ocupação de novas áreas. Dentre as atividades relacionadas ao agronegócio, a pecuária bovina brasileira tem merecido destaque no cenário mundial. O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, cerca de 170 milhões de cabeças, e ocupa, desde 2003, o primeiro lugar no ranking mundial de exportação de carne bovina (ANUALPEC, 2009).

As forrageiras constituem-se na fonte mais importante de alimento e são elementos cruciais para a competitividade brasileira de carne e de leite bovinos. O Brasil conta com mais de 190 milhões de hectares de pastagens, sendo quase 120 milhões de hectares ocupados por pastagens cultivadas (ANUALPEC, 2009).

Contudo, apesar da sua importância sócio-econômica, as pastagens não têm sido valorizadas e estão sob grande pressão antrópica, devido à expansão da agricultura e o manejo inadequado. As pastagens estão, em geral, relegadas aos solos de áreas marginais, com graves limitações de fertilidade e elevada acidez. Além disso, as mudanças climáticas, com interferências no ciclo de chuvas e de severidade de eventos extremos, de veranicos e de geadas, impactarão a produtividade e qualidade das pastagens.

***Brachiaria* spp.**

A evolução da pecuária no Brasil está muito relacionada a pastagens do gênero *Brachiaria*, dada a expressividade da referida forrageira no País. No estado de Mato Grosso, *B. brizantha* ocupa a maioria dos 80 milhões de hectares de pastagens, sendo as cultivares Marandu e Xaraés as mais plantadas. Grande parte destas áreas encontra-se em algum estágio de degradação, que pode estar associado com a presença de fungos fitopatogênicos (SANTOS et. al., 2007).

As espécies do gênero *Brachiaria* são as forrageiras predominantes, sobretudo nas regiões Centro-Oeste e Norte do país. Entre essas, *B. brizantha* cv. Marandu (capim-marandu, braquiarão ou brizantão) é a mais plantada (ANDRADE e VALENTIM, 2004).

A popularidade e aceitação do capim-marandu entre os pecuaristas resultaram na implantação de extensas áreas dessa gramínea no sistema de monocultivo. Tamaña adoção tornou o sistema de produção vulnerável aos estresses abióticos e/ou bióticos, capazes de reduzir a produtividade e a qualidade das forrageiras (VERZIGNASSI e FERNANDES, 2001). Problemas dessa natureza têm sido constatados nas regiões Centro-Oeste e Norte do país, onde extensas áreas de braquiarão se apresentam secas e mortas, constituindo entrave para a produção de carne.

A mortalidade do capim-marandu - MCM, ou síndrome da morte do capim-marandu, como é denominada por alguns autores, tem progredido rápida e irreversivelmente, potencializando, assim, o processo de degradação das pastagens. Embora não se saiba com exatidão, são estimados mais de 500 mil hectares de pastagem com sintomas de mortalidade.

Apesar dos esforços de profissionais de diferentes áreas de conhecimento e instituições, a etiologia do referido problema não está elucidada. A ocorrência de organismos fitopatogênicos de solo, como os pertencentes aos gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Fusarium*, isoladamente ou associados com nematóides do gênero *Pratylenchus* spp. (MARCHI et al., 2006) estão relacionados com o fenômeno da mortalidade da *Brachiaria* que estão ocorrendo nas pastagens do Estado do Mato Grosso e outras regiões do norte do Brasil. Tais patógenos são de grande relevância, pois além de permanecerem no solo por tempo relativamente prolongado, são passíveis de serem transmitidos por sementes.

Panicum spp.

Panicum maximum Jacq. [sinônimo: *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B. K. Simon & W. L. Jacobs] pertence à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae e gênero *Panicum*. Tem como centro de origem a África do Leste (COMBES e PERNES, 1970), onde, geralmente, ocorrem em margens florestais e em pastagens sob sombra de árvores (JANK, 1995).

Sua data de introdução no Brasil não é bem conhecida. Vários autores sugerem que os primeiros exemplares dessa espécie vieram da África para o País em navios negreiros, onde eram utilizados como cama para os escravos, e uma vez aqui, se alastraram rapidamente, dando origem a primeira cultivar, o Colômbio. Essa cultivar se adaptou tão bem às condições de solo e clima do Brasil, que em algumas regiões passou a ser considerado nativo. Grande parte da engorda de bovinos no País, até a década de 1980, foi baseada em capim-colômbio.

Posteriormente foram introduzidos materiais oriundos de estações de pesquisa estrangeiras e alguns se espalharam, como o Sempre Verde, Guiné, Guinezinho, Makueni, Embu, entre outros. Nenhuma destas, entretanto, revolucionou a pecuária nacional, uma vez que a cv. Colômbio, além de ser muito produtiva, apresenta excelente qualidade, é altamente adaptada e produz grandes quantidades de sementes.

A grande revolução na pesquisa em lançamentos de novas cultivares de *P. maximum* se deu quando, em 1982, Embrapa Gado de Corte recebeu do Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), hoje Institut de Recherche pour le Développement (IRD), uma coleção com 426 acessos e 417 plantas sexuais de *P. maximum* (JANK et al., 2008).

Trabalhos de caracterização morfo-agronômica na coleção revelaram que 40% produziram mais e apresentaram melhor estacionalidade de produção que o capim-colômbio. Desses acessos, os 25 melhores foram avaliados em uma Rede de Ensaios Regionais (JANK et al., 1993; JANK, 1995) e sete foram selecionados para serem avaliados sob pastejo, em pequenas parcelas, das quais foram liberadas duas cultivares, *P. maximum* cv. Tanzânia e *P. maximum* cv. Mombaça (JANK et al., 1994). Além desses lançamentos, outros acessos apresentaram características importantes, entre eles, o BRA-007102, que foi lançado posteriormente como *P. maximum* cv. Massai.

A cultivar mais produtiva das três lançadas pela Embrapa Gado de Corte é o capim-mombaça, 135% mais produtiva que o capim-colômbio, em termos de massa seca de folhas, e 27% mais produtiva que o capim-tanzânia, que por sua vez, é 85% mais produtiva que o capim-colômbio. O capim-massai tem produção de massa seca de folhas semelhante ao capim-colômbio. Todas essas cultivares apresentam maior porcentagem de folhas em sua constituição que o capim-colômbio, mas a única que o supera quanto à produção de sementes é o tanzânia.

Esses estudos que propiciaram o lançamento dessas cultivares, também revelaram que existe uma ampla variabilidade morfo-agronômica disponível na coleção (JANK, 1995, JANK et al., 1997). Estudos posteriores nesse germoplasma revelaram que também existe variabilidade para características relacionadas à adaptação, tais como tolerância a solos de baixa permeabilidade (GONTIJO et al., 2004; SILVA et al., 2006), ao sombreamento (JANK et al., 2005; VICTOR et al., 2006) e ao alumínio tóxico (ALMEIDA et al., 2000; LAURA et al., 2006).

A biologia dessa espécie também foi extensivamente estudada por vários autores (SAVIDAN, 1982), revelando uma maioria de ecótipos tetraplóides, com reprodução do tipo apomítica. Ecótipos sexuais diplóides foram, também, coletados na Tanzânia nos anos de 1967 e 1969 (COMBES e PERNES, 1970) e tiveram seus materiais genéticos duplicados na Costa do Marfim, pelo uso de colchicina (SAVIDAN, 1982), possibilitando a realização de cruzamentos intraespecíficos. Depois de realizados cruzamentos com ecótipos apomíticos, foram selecionados híbridos sexuais com estabilidade meiótica que foram, também, introduzidos no germoplasma da Embrapa Gado de Corte, em 1982. Foram realizados vários cruzamentos, após a introdução do germoplasma, e vários híbridos promissores encontram-se em fase final de avaliação (JANK et al., 2008).

Devido a relatos recentes de produtores sobre o aumento preocupante da incidência do fungo *Bipolaris maydis* em pastos plantados com *P. maximum* e, por sua vez, da doença causada por esse fungo (mancha foliar de *Bipolaris*) que interfere negativamente na produtividade dessa forrageira; da dificuldade de pulverização das áreas de pastagens com fungicidas; e do pastejo animal (JANK et al., 2008); o conhecimento sobre o(s) gene(s) envolvido(s) na resposta à infecção por esse patógeno reveste-se de extremo interesse para os programas de melhoramento genético de *P. maximum*, visando à obtenção de cultivares resistentes a esse patógeno que garantam a manutenção e a sustentabilidade da bovinocultura brasileira.

***Stylosanthes* spp.**

Conforme Fernandes (2003), apesar da comprovada contribuição de cultivares do gênero *Stylosanthes* ao sistema produtivo, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* tem limitado o uso dessa leguminosa. Tal doença provoca manchas nas folhas e em talos, além de desfolha severa em plantas suscetíveis. Isolados desse patógeno, sobretudo aqueles coletados em diferentes regiões do Brasil, principal centro de diversidade de espécies dessa leguminosa, demonstraram, em trabalhos prévios, alta variabilidade de patogenicidade e de agressividade em plantas hospedeiras e ainda, através de estudos com marcadores moleculares, tais isolados apresentam características muito distintas. Com esses trabalhos realizados concluiu-se a existência de distintas raças fisiológicas do fungo nas condições brasileiras (FERNANDES, 2003). Em virtude dessa característica do patógeno, o risco de “quebra” de resistência de cultivares já existentes no mercado é muito grande, fato que justifica a necessidade da busca de novos genótipos com alto grau de resistência à antracnose e com adaptação às condições edafoclimáticas na região de seu uso. Dessa forma, novas opções forrageiras poderão ser liberadas comercialmente aos pecuaristas em tempo hábil para o aumento ou manutenção da sua eficiência produtiva, já identificada com a cultivar Estilosantes Campo Grande. Também, o melhor entendimento do processo de infecção é importante parâmetro para a busca de estratégias efetivas de controle dessa doença.

Smyth et al. (1992), estudando a antracnose a partir de plantas inoculadas de *S. scabra*, verificaram que a velocidade da sua dispersão depende da proximidade do foco, do seu grau de infecção e do nível de resistência das plantas. A probabilidade de uma planta livre de doença, com vizinhas também sadias, apresentar a doença em um período de uma semana, é de 52% para cultivares susceptíveis, 6,5 a 23% para cultivares possuidoras de níveis variados de resistência e de apenas 2,8% para variedades resistentes. Na América do Sul, onde *Stylosanthes* é nativo, e também na Austrália, estudos têm revelado que há uma grande especialização patogênica de *C. gloeosporioides* (LENNÉ et al., 1984; IRWIN et al., 1986; CHAKRABORTY et al., 2001). Estudos de identificação de genes de resistência do hospedeiro e de virulência do patógeno vêm sendo feitos (VINIJSANUN et al.; 1987; Chakraborty et al., 2002), mas ainda há muito para progredir nesta área.

Conforme Chakraborty et al. (1988), há dois tipos distintos de sintomas causados por *C. gloeosporioides* na Austrália – tipos A e B. O tipo A ocorre em todas as espécies de *Stylosanthes* e é caracterizado por lesões marrom claras a cinza, com margens escuras em caules, folhas e inflorescências e é economicamente mais importante. O tipo B, encontrado somente em *S. guianensis*, forma uma necrose geral com margem não definida em caules e folhas. Em trabalhos já realizados na Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande-MS, tais tipos de sintomas foram observados. Também, em estudos de inoculação artificial de isolados do patógeno provenientes de diferentes regiões do País em hospedeiros diferenciadores, foi verificada a ampla variabilidade de patogenicidade e de agressividade do patógeno, além de formação de diferentes agrupamentos de isolados quando os mesmos foram caracterizados por meio de técnicas moleculares (RAPD) (DAVIS et al., 1984; CHAKRABORTY et al., 1997; WEEDS, 2003). Esses últimos autores informam ainda que a variabilidade patogênica e molecular do patógeno é mais expressiva no Brasil (onde a doença é endêmica) que na Austrália, onde o hospedeiro e o patógeno foram introduzidos. Na Austrália, a especialização patogênica em *C. gloeosporioides* tem superado a resistência de várias novas cultivares em tempo relativamente curto após o seu lançamento comercial. Esse fenômeno foi primeiramente observado com a identificação da antracnose tipo B em acessos de *S. guianensis* e do tipo A em acessos de *S. viscosa* (IRWIN e CAMERON, 1978). Desde então, a especialização patogênica desse fungo foi reportada em *S. scabra* (DAVIS et al., 1984) e *S. guianensis* (IRWIN et al., 1986).

Devido ao custo operacional, a única opção viável para manejo da antracnose em pastagens é a utilização de hospedeiros resistentes. Conforme já foi apresentado, a variabilidade da população do patógeno é o maior entrave para a utilização de resistência efetiva e estável para o manejo antracnose. Assim, para a obtenção de sucesso no controle de raças do fungo, torna-se necessário estabelecer estratégias efetivas, atuando-se principalmente sobre o hospedeiro (FERNANDES, 2003).

Três locus de genes com alelos dominantes para resistência foram estudados em reações à antracnose de populações F2 de *S. guianensis*, inoculadas com as raças 1 e 3 do tipo B do patógeno (IRWIN et al., 1984). Segundo esses autores, CPI 18750 possui um simples gene dominante para resistência à raça 1 e parece estar no mesmo locus do gene de resistência de CPI 34911, enquanto

Graham e CPI 79639 possuem um gene dominante para resistência à raça 1 do tipo B. Em contraste, a herança da resistência para patógenos do tipo A, que ocorre em *S. capitata* e *S. macrocephala*, não é ainda bem entendido. Godwin et al. (1990) relataram um gene maior mutante de dominante para recessivo, para conferir suscetibilidade do tipo A em famílias de segunda geração somaclonal (SC2) de *S. hamata*. Essa perda de resistência foi atribuída a trocas genéticas do hospedeiro. Ocorrência similar conferiu aumento da resistência em famílias SC2 de *S. scabra* cv. Fitzroy (CHAKRABORTY e BILLARD, 1995). Conforme Chakraborty et al., (1997), marcadores moleculares para estudos de genes de resistência à antracnose serão progressivamente usados para combinar genes de resistência de diferentes estudos genéticos. Quando disponíveis, espera-se utilizar esses genes “pirâmidados” para oferecer proteção estável e efetiva contra a antracnose.

Cigarrinhas das pastagens

A gramínea *Brachiaria decumbens* se adaptou perfeitamente às condições de baixa fertilidade e elevada acidez dos solos dos cerrados. A aceitação por parte dos pecuaristas foi tal que não só nos cerrados, mas também em outras regiões, milhões de hectares foram estabelecidos com essa gramínea, originando extensas monoculturas. Nessas condições, essa forrageira ficou vulnerável ao ataque de insetos, permitindo, particularmente, explosões populacionais das cigarrinhas das pastagens. O comprometimento das pastagens, anualmente atacadas por estes insetos, tem se constituído problema relevante dentro da bovinocultura de corte nacional. Embora os severos danos causados pelas cigarrinhas sejam muito evidentes, não existem dados sobre o impacto dos mesmos na produção animal. Como mencionado por Pottinger (1976), as perdas ocasionadas por insetos em culturas anuais são relativamente fáceis de serem estimadas devido ao efeito direto na colheita. Porém, avaliar o dano de insetos em pastagens em termos de produção animal é complexo, oneroso e difícil. Tentativa nesse sentido foi feita por Holmann e Peck (2002), usando modelo de simulação como ferramenta de análise. Estes autores estimaram prejuízo econômico de até 273 milhões de dólares, para uma área de 4,7 milhões de hectares de pastagens suscetíveis no trópico-úmido da Colômbia. Extrapolando, e de forma conservadora, para o Brasil, estes prejuízos seriam superiores a um bilhão de dólares, só nas áreas estabelecidas com *B. decumbens*.

A ocorrência das cigarrinhas coincide com a estação chuvosa. São inúmeras as espécies de cigarrinhas que, distribuídas por vários Estados brasileiros, têm causado reduções acentuadas na capacidade de suporte das pastagens. O complexo cigarrinhas-das-pastagens inclui, principalmente, as seguintes espécies: *Deois incompleta* (Walker) e *Mahanarva* sp., importantes na região Norte do país; *Notozulia entreriana* (Berg), *Deois schach* (F.) e *Aeneolamia selecta selecta* (Walker) importantes para o Nordeste; e *Deois flavopicta* (Stal), que, juntamente com a espécie *N. entreriana*, predomina nos Estados do Brasil Central, Paraná e na região Leste.

Visando ao controle das cigarrinhas, estudos tratam da biologia (DOMINGUES e SANTOS, 1975; RAMOS, 1976), ecologia (FONTES et al., 1995; PECK, 1998; SUJII, 1998), de aspectos taxonômicos (SAKAKIBARA, 1979; CARVALHO, 1995), de dinâmica populacional (MILANEZ, 1980, MARTIN et al., 1995), de caracterização e avaliação de danos (VALÉRIO, 1985; VALÉRIO e NAKANO, 1987a; VALÉRIO e NAKANO, 1987b; VALÉRIO e NAKANO, 1987c; VALÉRIO e NAKANO, 1992) e de plantas hospedeiras (MENEZES, 1982).

O controle químico, avaliado por alguns autores como Silveira Neto (1976) e El-Kadi (1980), é de aplicação limitada por ser antieconômico. Na realidade, as pastagens são tidas como culturas de baixo valor por unidade de área, limitando em muito a adoção de medidas como o uso de inseticidas no controle das cigarrinhas. Aliado ao aspecto econômico há, também, limitações de ordem ecológica associado ao tratamento de extensas áreas.

Na busca de métodos alternativos, conduziram-se estudos nas áreas de controle biológico e controle cultural, sendo que este envolveu práticas de manejo de pastagem bem como avaliação de gramíneas para resistência às cigarrinhas.

Quanto ao controle biológico, ênfase tem sido dada à utilização do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae*. Trabalhos como de Veiga et al. (1972), Costa e Magalhães (1974), Matta (1977), Alves et al. (1980) e Borges (1985) entre outros, traduzem a grande expectativa em torno desse fungo que, se em laboratório revelou grande potencial, nas condições de campo tem apresentado resultados inconsistentes. Mais recentemente se tem verificado um crescimento na oferta desse fungo, seja pelo aumento do número de empresas no mercado, seja por iniciativas regionais, como é o caso da prefeitura de São José do Rio Claro, MT, que montou infraestrutura para produzir o fungo e atender a demanda local. Adicionalmente, formulação à base de óleo emulsionável foi desenvolvida (ALVES et al., 1998) na expectativa de se obter maior eficiência e praticidade em relação aos produtos não formulados, produzidos à base de arroz inteiro ou triturado.

Acredita-se que esse inimigo natural possa contribuir no controle das cigarrinhas, em especial nas regiões do país com alta precipitação. Em verdade, o controle biológico das cigarrinhas, apesar do grande potencial que apresenta, tem sido implementado de forma limitada (BARBOSA, 1990). Além dos esforços que têm sido concentrados na avaliação e utilização do fungo *M. anisopliae*, estudos adicionais são necessários com outros agentes de controle biológico das cigarrinhas como, por exemplo, a larva da mosca *Salpingogaster nigra*, eficiente predador de ninfas (MARQUES, 1988); adultos da mosca *Porasilus barbiellini*, predador de adultos de cigarrinhas (BUENO, 1987) e, em especial, com parasitóides de ovos, seja com *Acmopolynema hervali* assim como com *Anagrus* sp (PIRES et al., 1993) e *Anagrus urichi* (VALÉRIO e OLIVEIRA, 2005).

A prática do manejo de pastagens como alternativa de controle tem gerado controvérsias. Em verdade, esta é uma área ainda em descoberto necessitando de mais avaliações.

A avaliação de gramíneas forrageiras quanto à resistência às cigarrinhas apresenta grande potencial. Após vários anos de pesquisa, há hoje o consenso de que os esforços devam ser concentrados nesta linha de pesquisa (VALÉRIO, 2008).

Considerando que a atividade na bovinocultura de corte no Brasil é basicamente extensiva, tem-se que o sucesso na adoção de medidas de controle dependerá da maneira como estas medidas alterarão as práticas rotineiras neste sistema de produção, ou seja, as medidas a serem recomendadas não poderão ser tais que venham intensificar o sistema de uso. As eventuais proposições deverão ser de baixo custo e fácil adoção. Aqui reside o grande potencial da utilização de gramíneas resistentes.

A busca de gramíneas alternativas para a composição de um quadro mais diversificado no contexto da exploração deve ser uma constante. Ao se liberar no futuro, novas cultivares que além de boas características agrônômicas, apresentem, também, alto nível de resistência às cigarrinhas, estar-se-á oferecendo aos produtores uma alternativa de controle.

Trabalhos como os de Bianco e Villacorta (1978), Cosenza (1981), Valério e Koller (1982) e Nilakhe (1987), evidenciaram pelo menos duas gramíneas resistentes às cigarrinhas: *Andropogon gayanus* cv. Planaltina e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, as quais foram bem aceitas pelos produtores.

Procurando ajustar metodologia para avaliação de gramíneas forrageiras, na busca de material resistente às cigarrinhas, Lapointe et al. (1989a) e Ferrufino e Lapointe (1989) apresentaram resultados promissores quanto às possibilidades de se encontrar gramíneas resistentes. Posteriormente, Cardona et al. (1999) desenvolveram metodologia para seleção massal de gramíneas forrageiras visando resistência às cigarrinhas.

O Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC) da EMBRAPA dispõe de duas coleções de gramíneas forrageiras, sendo uma do gênero *Brachiaria* (ao redor de 600 introduções) e outra da espécie *Panicum maximum* (aproximadamente 400 introduções). Parte deste germoplasma já foi avaliado. Recentemente, avaliações forma iniciadas, também, com o gênero *Paspalum*. Tanto resultados como considerações a respeito deste processo de avaliação têm sido divulgados (THOMAS e LAPOINTE, 1989; VALÉRIO e VALLE, 1990; VALÉRIO, 1992; LAPOINTE et al., 1992; VALÉRIO et al., 1993a; MILES et al., 1995; VALÉRIO et al., 1996; VALÉRIO et al., 1997; VALÉRIO e SOUZA, 1997; VALÉRIO et al., 2001; VALÉRIO, 2008; SOTELO et al., 2003; CARDONA et al., 2004).

Viroses em forrageiras tropicais

A ocorrência de vírus em espécies de forrageiras no Brasil é pouco relatada. Até o presente, são poucos os vírus que foram detectados infectando naturalmente plantas dos gêneros *Brachiaria*, *Panicum* e *Stylosanthes* e que tiveram sua espécie identificada.

Em *Brachiaria* sp., já foi relatada a ocorrência de potyvirus, especificamente a estirpe de *Johnson Grass Mosaic Virus* (JGMV), designada JGMV-Brac (MORALES et al., 1996). Em folhas de *Stylosanthes scabra* exibindo sintomas de mosaico, Kitajma et al. (1997) observaram ao Microscópio Eletrônico de Transmissão a ocorrência de inclusões citoplasmáticas típicas de infecção por potyvirus. No entanto, a espécie viral não foi identificada. Em outras regiões do mundo, outro potyvirus não identificado ao nível de espécie foi observado em *Stylosanthes* sp., porém, possivelmente representa uma estirpe de *Peanut mottle potyvirus* (PMoV) (MORALES et al., 1991). *Alfafa mosaic alfamovirus* (AMV) foi detectado em campos de multiplicação de sementes do "International Livestock Research Institute"(ILRI) – Etiópia pela primeira vez em *S. scabra* (MIH e HANSON, 1998). O *Bean common mosaic potyvirus*-estirpe PStV foi observado infectando naturalmente plantas de *S. capitata* e *S. scabra* (MISHRA et al., 1993).

No tocante há vírus encontrados infectando plantas do gênero *Panicum*, *Panicum mosaic sobemovirus* (PMV) foi detectado em infecção natural de *P. virgatum* ("switchgrass") no México e E.U.A.

(SILL e PICKETT, 1957). PMV pode ser transmitido mecanicamente e também por sementes de certas plantas, sendo que, sob condições experimentais, PMV infectou basicamente plantas da família Poaceae: *Avena sativa*, *Eremochloa ophiuroides*, *Hordeum vulgare*, *Muhlenbergia schreberi*, *Panicum dichotomiflorum*, *Panicum miliaceum*, *P. virgatum*, *Secale cereale*, *Setaria italica*, *Sorghum bicolor*, *Stenotaphrum secundatum* ("St. Augustine decline strain"), *Triticum aestivum*, *Triticum durum* e *Zea mays* (BÜCHEN-OSMOND, 2004). Entre as plantas não susceptíveis a PMV, citam-se: *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus*, *Chenopodium quinoa* e, *Tetragonia tetragonioides* (BÜCHEN-OSMOND, 2004). Em células infectadas, observam-se inclusões citoplasmáticas em cristais, podendo conter vírions maduros, além de desorganização de mitocôndrias e tonoplasto (BÜCHEN-OSMOND, 2004). Há ainda relato do *Satellite Panicum mosaic virus* (SPMV) que foi isolado de *P. virgatum* (NIBLETT e PAULSEN, 1975), e consiste em RNA fita simples que depende de um vírus auxiliar, no caso o PMV, para a sua replicação. *Panicum streak mastrevirus* (PanSV) foi encontrado, no Quênia, África do Sul e Uganda, infectando *P. maximum* e causando estrias cloróticas em folhas, (BOCK et al., 1974). PanSv não é transmitido mecanicamente, mas apenas por hemípteras da família *Cicadellidae* (BÜCHEN-OSMOND, 2004). *Guinea grass mosaic potyvirus* (GGMV) foi isolado de *P. maximum* (THOUVENEL et al., 1976), sendo registrada sua ocorrência na Costa do Marfim, Brasil e Colômbia. O GGMV não é transmitido por sementes, no entanto, é transmitido mecanicamente e provavelmente por afídeos (THOUVENEL e MORALES, 2004). São hospedeiras experimentais de GGMV: *Avena fatua*, *Bromus macrostachys*, *Bromus sterilis*, *Echinochloa crus-galli*, *Eleusine coracana*, *Pennisetum americanum*, *Setaria italica*, *Stenotaphrum secundatum* e *Zea mays* (BÜCHEN-OSMOND, 2004). O *Barley yellow dwarf luteovirus* (BYDV) também foi detectado infectando naturalmente plantas de *Panicum virgatum* (GARRET et al., 2004).

No contexto dos programas de melhoramento genético de forrageiras, a seleção de genótipos de plantas resistentes a doenças é um aspecto relevante. Para selecionar plantas resistentes a doenças é necessário o conhecimento prévio do agente etiológico. Todavia, nem sempre os patógenos causadores das doenças são identificados taxonomicamente.

e) objetivos, metas a serem alcançados e seus respectivos indicadores

e.1) Objetivos:

Objetivo Geral:

- Identificar a etiologia de viroses, genes envolvidos em processos de resistência, bem como fontes de resistência de plantas forrageiras tropicais aos principais patógenos.

Objetivos Específicos

- Identificar genótipos de *Brachiaria* spp., *Panicum* spp. e *Stylosanthes* spp. resistentes às principais doenças incidentes e efeito supressório de esporulação de *Sclerotinia Sclerotiorum* pela palhada de forrageiras;
- Determinar a etiologia de doenças de forrageiras tropicais causadas por vírus e fitoplasmas e prospectar genótipos vegetais com resistência natural a vírus transmitidos mecanicamente.
- Avaliar e selecionar gramíneas forrageiras resistentes às cigarrinhas das pastagens (*Hemiptera: Cercopidae*);
- Desenvolver ESTs e buscar genes em gramíneas forrageiras envolvidos na resistência a estresses bióticos a partir de dados gerados por pirosequenciamento massal;
- Identificar em *P. maximum* sequências diferencialmente expressas relacionadas à resistência ao fungo *Bipolaris maydis*, visando-se a sua utilização na seleção assistida para essa característica dentro do programa de melhoramento da espécie;
- Construir o mapa genético de QTLs para resistência à antracnose em *Stylosanthes guianensis*;

e.2) Metas:

- Estabelecer, em 36 meses, genótipos de forrageiras resistentes às principais doenças viróticas e fúngicas incidentes
- Consolidar, em 18 meses, nova metodologia de criação de cigarrinhas-das-pastagens;

- Consolidar, em 18 meses, a nova metodologia de avaliação massal de gramíneas forrageiras quanto à resistência às cigarrinhas na Embrapa Gado de Corte;
- Avaliar, em 24 meses, 100 híbridos/ano de gramíneas forrageiras quanto à resistência às cigarrinhas.
- Avaliar, usando método massal de seleção, 500 híbridos de gramíneas forrageiras quanto à resistência às cigarrinhas.
- Obter, em 36 meses, uma biblioteca de sequências diferencialmente expressas de *P. maximum* em resposta ao fungo *Bipolaris maydis*;
- Obter, em 36 meses, o máximo de sequências de cDNA diferencialmente expressos para análise em bancos de dados;
- Caracterizar, em 24 meses, o padrão de expressão dos cDNAs diferencialmente expressos utilizando RT-qPCR início
- Ter caracterizado, em 24 meses, o padrão de expressão de genes (se induzidos ou reprimidos) potencialmente relacionados com a resposta da planta a infecção pelo patógeno.
- Construir, em 36 meses, um mapa genético para *S. guianensis*
- Obter, em 36 meses, o máximo de saturação de um mapa genético para *S. guianensis* com marcadores SSR.
- Mapear, em 36 meses, de QTLs para resistência a antracnose em *S. guianensis*
- Utilizar, em 36 meses, o mapa genético obtido e os dados de fenotipagem para antracnose para a determinação de QTLs relacionados à resistência a antracnose em *S. guianensis*.
- Identificar, em 12 meses, para cada espécie, pelo menos 100 ESTs diferencialmente expressos em resposta à praga/patógeno e selecionar pelo menos 10 genes candidatos à resistência
- Construir e implementar, em 12 meses, um banco de ESTs para estudo da interação braquiária x cigarrinhas-das-pastagens e *Panicum x Bipolaris*
- Descrever, em 24 meses, a etiologia de pelo menos 2 potenciais doenças virais ocorrentes em forrageiras tropicais
- Prospectar, 24 meses, genótipos vegetais de forrageiras com resistência natural a vírus transmitidos mecanicamente.
- Treinar, em 36 meses, pelo menos seis estudantes de pós-graduação.

f) descrição de como o projeto está inserido no Plano de Gestão da Rede;

O projeto está inserido na Rede “Desenvolvimento de cultivares de forrageiras nativas e exóticas: mudanças climáticas e produção sustentável de proteína animal” (Figura 1 anexada a este projeto), coordenado pela Dra. Cacilda Borges do Valle, da Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande-MS. Os resultados alcançados com a realização deste projeto contribuirão, sobremaneira, para o sucesso da Rede como um todo, pois, para forrageiras, a obtenção de fontes de resistência a doenças e pragas, é condição essencial para o sucesso do uso de uma cultivar, já que várias outras formas de controle, como o químico, não se ajustam, devido ao baixo retorno econômico da pecuária por unidade de área.

g) metodologia a ser empregada;

O projeto será coordenado pela Embrapa Gado de Corte, com participação de várias outras instituições da Região Centro-Oeste, além daquelas de outras regiões.

Ação 1: Seleção de genótipos/cultivares de *Brachiaria*, *Panicum* e *Stylosanthes* para resistência a fungos, *Pythium* spp. e fitonematóides

Os experimentos desta ação de pesquisa serão conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação da Embrapa Gado de Corte.

1.1. Obtenção e produção de isolados de organismos para estudos de resistência genética de genótipos de forrageiras

Conforme informações da literatura e experiências acumuladas pela equipe deste projeto, serão utilizados para a avaliação de resistência de genótipos das forrageiras em estudo, gêneros de patógenos que são considerados de maior relevância com agentes causadores de doença, quais sejam:

- a) *Brachiaria* spp.: *Claviceps maximensis*, *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Pratylenchus* spp.
- b) *Panicum maximum*: *Bipolaris maydis*, *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Pratylenchus* spp.
- c) *Stylosanthes* spp.: *Colletotrichum gloeosporioides*.

Os isolados dos patógenos supracitados serão obtidos em áreas de produção de *Brachiaria*, *Panicum* e *Stylosanthes*, em diferentes regiões do Estado do Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Para tanto, serão feitas viagens para a coleta de amostras de plantas exibindo sintomas das respectivas doenças causadas pelos referidos patógenos nas forrageiras.

Para os isolamentos dos fungos relacionados anteriormente e do *Pythium* spp., serão processadas amostras da planta forrageira que apresentarem sintomas das respectivas doenças. Pequenos fragmentos de tecido, retirados a partir das lesões de onde o patógeno estiver infectando, serão desinfetados superficialmente com álcool 50% durante 30 segundos, em solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante um minuto e 15 segundos e então lavados em água destilada com posterior plaqueamento em meio ágar-água. As placas serão mantidas em câmara BOD com temperatura próxima aos 28°C e fotoperíodo de 12 horas. Após dois dias, discos das culturas serão repicados em placas com meio batata-dextrose-ágar (BDA), nas mesmas condições citadas anteriormente. Para *Pythium* spp., caso se tenha sucesso do seu isolamento usando esta metodologia, utilizar-se-á a técnica de isca, usando-se sementes de sorgo em bandeja contendo solo encharcado e raízes da planta infectada.

Após a identificação dos patógenos, os mesmos serão repicados em placas com meio batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos em câmara BOD próxima aos 28°C e fotoperíodo de 12 horas.

Para a extração de fitonematóides oriundos de plantas exibindo sintomas típicos de nematoses, serão amostradas raízes e solo em propriedades de Mato Grosso com ocorrência da síndrome de morte súbita do capim Marandu (SMSM). Para a extração dos nematóides, as raízes serão separadas do solo, lavadas em água corrente e, após secarem sobre papel jornal por aproximadamente 20 minutos, serão pesadas. A seguir, todo o sistema radicular será picado em segmentos de aproximadamente 1 cm e processados pelo método de Coolen e D' Herde (1972) para a extração dos nematóides. O solo será processado pelo método de Jenkins (1964) ou método do peneiramento em flutuação em centrífuga. Tal técnica permite a separação dos nematóides, presentes na amostra, da matéria orgânica e das frações arenosas e argilosas do solo. As amostras de solo e de raízes coletadas serão processadas nos laboratórios de Fitopatologia da UFMT, campus Cuiabá e Barra do Garças e a identificação e quantificação dos fitonematóides presentes nas amostras serão realizadas no Laboratório de Fitonematologia da UNESP de Jaboticabal.

1.2. Avaliação do grau de resistência de genótipos de *Brachiaria*, *Panicum* e *Stylosanthes* para resistência aos principais fungos e *Pythium* spp. e supressão de *Sclerotinia sclerotiorum*

Genótipos promissores de *Brachiaria*, *Panicum* e *Stylosanthes*, pré-selecionados na Embrapa para a produtividades de forragem e de sementes e adaptadas às condições edafoclimáticas de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, serão avaliados quanto à sua reação de resistência aos seus principais patógenos, conforme descrito no item 1.1 deste projeto. Também, será avaliada a capacidade supressora da palhada de plantas forrageiras à produção de ascósporos de *S. sclerotiorum*. Assim, serão testados, em casa de vegetação, cerca de 20 genótipos de *Brachiaria* spp., 20 de *Panicum maximum* e 15 leguminosas forrageiras (*Stylosanthes capitata*, *S. macrocephala*, *S. guianensis*, *S. scabra*, *S. seabrana*, *Arachis pintoi*, *Cajanus cajan* e *Leucaena leucocephala*).

Em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições, cada organismo será inoculado de forma isolada ou em combinação (caso de doença complexa, como a Síndrome da Morte súbita do capim Marandu) em seu respectivo hospedeiro. As unidades experimentais constarão plantas desenvolvidas em vasos com 2,5 litros de capacidade, contendo uma mistura (1:1) de solo + areia autoclavada. Cada organismo será inoculado seguindo-se protocolo adequado para o gênero do patógeno. No caso dos organismos de solo, os mesmos serão inoculados na camada 0-5 cm do solo e, posteriormente, será realizada a semeadura da forrageira em teste. Um tratamento adicional sem a aplicação dos patógenos constituirá a testemunha.

Em condições de campo, na Embrapa Arroz e Feijão, em Goiânia-GO, em área naturalmente infestada com *S. sclerotiorum* serão implantados os mesmos genótipos supracitados, visando-se avaliar a capacidade superessora da palhada das referidas plantas forrageiras à produção de ascósporos do

referido fungo. O experimento será em blocos ao acaso com quatro repetições. As parcelas serão constituídas de 10 linhas de 5m de comprimento espaçadas de 0,45m entre si.

As avaliações serão realizadas usando-se metodologia adequada para cada patógeno, quando serão obtidos dados de incidência e severidade de cada doença. As análises das informações obtidas serão realizadas com auxílio do Programa SAS.

1.3 Hospedabilidade de plantas forrageiras à *Pratylenchus* spp.

a) Produção de inóculo

A(s) espécie(s) de *Pratylenchus* a ser(em) inoculada(s) dependerá da identificação do patógeno presente nas amostras obtidas e analisadas no item 1.1. deste projeto.

Esta etapa do trabalho consiste na multiplicação, em planta suscetível, da população do nematóide coletada, para posterior inoculação nas plantas forrageiras que serão avaliadas. Desta forma, o tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) cv. 'Santa Cruz', por promover alto índice de reprodução de *Pratylenchus* spp. (CHARCHAR e HUANG, 1981), será semeado em tubetes plásticos contendo substrato para a produção de mudas e mantidos em casa de vegetação. Após o período de desenvolvimento inicial, as plântulas serão transplantadas para vasos de argila, com capacidade de 2,5 L, preenchidos com solo + areia (1:1) autoclavado, onde serão inoculadas com cerca de 2000 ovos/juvenis de *Pratylenchus* spp.

A inoculação será realizada mediante pipetagem de volumes pré-ajustados da solução contendo ovos/juvenis de *Pratylenchus* spp., obtidos através do processamento de raízes de tomateiro e posterior deposição em 2 orifícios de 2cm de profundidade à 2cm de distância do colo das plantas.

Os espécimes de *Pratylenchus* spp. recuperados das raízes e do solo, serão inativados em banho-maria à temperatura de 55°C por 5 minutos e fixados em formalina (2%) para serem quantificados. A determinação do número de nematóides será realizada, por amostragem, em alíquotas de 1,0mL, com o auxílio de lâmina de contagem de Peters, sob microscópio óptico binocular.

O experimento de hospedabilidade visará avaliar a dinâmica de *Pratylenchus* spp. em presença de diferentes espécies de plantas forrageiras, como forma de obter informações relevantes perante o planejamento de sucessão de culturas num sistema de integração lavoura-pecuária. Assim, serão testados, em casa de vegetação, cerca de 20 materiais do gênero *Brachiaria*, 20 de *Panicum* e 15 leguminosas forrageiras (*Stylosanthes capitata*, *S. macrocephala*, *S. guianensis*, *S. scabra*, *S. seabrana*, *Arachis pintoi*, *Cajanus cajan* e *Leucaena leucocephala*, dentre cultivares comerciais e genótipos promissores pré-selecionados para a produção de sementes e forragens adaptadas as condições edafoclimáticas de Mato Grosso. Serão utilizados os materiais de Soja 'Monsoy 8866', milho 'BRS – 106' (DIAS-ARIEIRA et al., 2009) e *Tagetes patula* (INOMOTO et al., 2006) considerados como padrões, os dois primeiros de suscetibilidade e o terceiro de resistência.

Mudas dos materiais a serem avaliados serão produzidas em substratos e recipientes específicos e posteriormente transplantadas para vasos com 2,5L de capacidade, contendo uma mistura (1:1) de solo + areia autoclavada. Após o estabelecimento das mudas, estas serão inoculadas com 1000 ovos/juvenis de *P. brachyurus*, conforme descrito anteriormente. Aos 90 dias após a inoculação serão realizadas as avaliações através do processamento das raízes e do solo, quantificação dos espécimes obtidos e cálculo das variáveis.

Serão avaliados os nematóides por grama de raiz (NGR), o fator de reprodução (FR – corresponde ao valor obtido através da divisão da População Final (PF) pela População Inicial (PI) de nematóides contidos nas raízes), Nematóides no solo (NS – através da quantificação dos espécimes recuperados do solo contido nos vasos) e a Produção de matéria seca da parte aérea (MS).

Ação 2: Identificação de vírus e fitoplasmas ocorrentes em forrageiras tropicais

2.1) Identificação de vírus e fitoplasmas ocorrentes em genótipos de forrageiras

Plantas sintomáticas de forrageiras serão coletadas em áreas de pastagens na região Centro-Oeste, como também, nas coleções de *Panicum maximum*, *Brachiaria* spp. e *Stylosanthes* spp., disponíveis na Embrapa Gado de Corte e Embrapa Cerrados. Tais plantas serão multiplicadas vegetativamente e mantidas em casa de vegetação. Preparações de folhas sintomáticas serão observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão, a fim de se verificar indícios da família viral presente ou da presença de fitoplasma no floema. Em se confirmando a presença de vírus ou fitoplasmas, pretende-se

amplificar, por (RT)-PCR, genes relacionados à taxonomia viral e de fitoplasmas, clonar e sequenciar esses genes para fins de identificação taxonômica das estirpes estudadas.

2.2) Prospecção de genótipos de forrageiras com resistência natural a vírus transmitidos mecanicamente.

A transmissibilidade mecânica dos vírus identificados será testada por inoculação usando-se abrasivo e extratos de folhas de sintomáticas como inóculo. Em se identificando algum vírus transmitido mecanicamente, extratos de folhas sintomáticas serão usados como inóculo para rastrear genótipos de forrageiras por resistência natural a vírus transmitidos mecanicamente. Após a inoculação das plantas, a ocorrência de sintomas será acompanhada e os genótipos que não apresentarem sintomas serão reservados para introdução em programa de melhoramento, visando-se o desenvolvimento futuro de cultivares resistentes a viroses.

Ação 3: Genes e proteínas de forrageiras envolvidos na resistência a estresses bióticos

3.1. Desenvolvimento de ESTs (*expressed sequence tag*) e busca de genes em gramíneas forrageiras envolvidos na resistência à estresses bióticos a partir de dados gerados por pirosequenciamento massal

Serão utilizados nos bioensaios duas cultivares de *Brachiaria brizantha* e dois genótipos de *Panicum maximum* que se mostraram contrastantes quanto à resistência à cigarrinha-da-pastagem *Notozulia entreiriana* e ao fungo *Bipolaris maydis*, respectivamente.

3.1.1. Cultivo das plantas e bioensaios

a) *Panicum maximum*

O cultivo das plantas será realizado em condições semi-controladas, utilizando-se a estrutura disponível na Embrapa Gado de Corte. Sementes de cada genótipo serão germinadas em bandejas e as mudas serão transplantadas para vasos ao atingirem cerca de 10 cm de altura. Serão preparados 48 vasos para cada genótipo, com 3 plantas/vaso. Os vasos receberão irrigação diariamente para que mudas se desenvolvam normalmente por 30 dias, quando alcançarão porte apropriado para o bioensaio.

a.1. Bioensaio *P. maximum* x *Bipolaris maydis*

Para cada genótipo avaliado, metade dos vasos terá suas plantas pulverizadas com uma suspensão de inóculo de *B. maydis*, preparado de acordo com Tanaka (1987). Em seguida os vasos inoculados serão acondicionados em uma câmara úmida, sob temperatura de 28-30°C e umidade relativa de 100%. Os vasos do tratamento controle permanecerão livres do fungo patogênico. As folhas serão coletadas 1, 2, 3 e 4 dias após a inoculação. As folhas das plantas saudáveis serão coletadas nos mesmos pontos de intervenção dos vasos inoculados. À medida que as folhas forem coletadas, estas serão mantidas em nitrogênio líquido (-196°C). De volta ao laboratório, as amostras serão devidamente armazenadas a -80°C.

b) *Brachiaria brizantha*

O cultivo das plantas será realizado em condições controladas, utilizando-se a estrutura disponível na Embrapa Gado de Corte. Sementes de cada cultivar serão germinadas em bandejas distintas, e estas acondicionadas em gaiolas teladas e mantidas em casa-de-vegetação, para evitar a ação de insetos sobre as plantas. Ao atingirem cerca de 10 cm de altura, as mudas serão transplantadas para vasos. Serão preparados 40 vasos para cada cultivar, contendo 10 mudas cada um, e estes serão colocados em uma casa telada, onde serão distribuídos em dois balcões: sobre cada um deles, serão acomodados vinte vasos com mudas da cv. Marandu e outros vinte vasos com a cv. Arapoty. Todos os vasos serão protegidos por uma gaiola telada, a ser fixada na base do balcão. Os vasos receberão irrigação

diariamente, até que as mudas atinjam altura aproximada de 35 cm, porte apropriado para o experimento com os insetos, seguindo-se as recomendações de Valério e Nakano (1992).

b.1. Bioensaio *B. brizantha* x *Notozulia entreriana*

Cada planta será infestada com 20 fêmeas adultas da cigarrinha *N. entreriana*, coletadas no campo, com reposição diária dos insetos mortos. As plantas infestadas serão monitoradas diariamente, com o propósito de acompanhar visualmente a evolução dos sintomas dos danos causados pelas cigarrinhas. As folhas serão coletadas 24h, 48h e 96h após a infestação, sendo esta última coleta coincidente com a observação de sintomas muito expressivos nas plantas, que caracterizam-se por regiões cloróticas localizadas ao redor do ponto de sucção, evoluindo para pontos distantes à medida que se aumenta o tempo de alimentação. As folhas das plantas sadias serão coletadas nos mesmos pontos de intervenção dos vasos infestados. À medida que as folhas forem coletadas, estas serão mantidas em nitrogênio líquido (-196°C). De volta ao laboratório, as amostras serão devidamente armazenadas a -80°C.

3.1.3. Extração de RNA e síntese do cDNA

O RNA total das folhas de plantas sob estresse e controle será extraído utilizando-se Trizol Reagent (Invitrogen), baseado no protocolo descrito pelo fabricante. Após o tratamento com DNase (Ambion) para eliminação de possíveis contaminações, o RNA total será avaliado qualitativamente em gel de agarose 1,0%.

A etapa seguinte consiste na extração do mRNA e síntese do cDNA, que será produzido de acordo com o método descrito por Cheung et al. (2006), utilizando-se o kit SMART (Clontech. Laboratories, Inc.). A população final de cDNA será fragmentada por nebulização em pequenos fragmentos de centenas de pares de base e enviada para o pirosequenciamento massal.

3.1.4. Sequenciamento em plataforma 454

O sequenciamento será realizado pela Unidade de Genômica Computacional Darcy Fontoura de Almeida, situada no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), que dispõe de um sequenciador 454 FLX (Roche Applied Science). A tecnologia 454 utiliza microesferas sintéticas banhadas em emulsão oleosa, onde ocorre o alongamento da cadeia de DNA, seguida pela liberação de fótons. Estes dados são interpretados na forma de desoxinucleotídeos incorporados a cadeia de DNA, formando assim as seqüências. Serão sequenciadas duas placas de cada espécie, contendo o cDNA correspondente das plantas coletadas em pontos específicos do processo de infecção/infestação.

3.1.5. Análise bioinformática dos dados

A análise das seqüências geradas será realizada no Laboratório de Genômica e Proteômica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

A criação de um banco de dados de referência incluindo um conjunto de unigenes representativo de *P. maximum* x *B. maydis* é uma etapa essencial para as análises de expressão gênica diferencial. Esse banco será obtido através de ferramentas de bioinformática que realizam a montagem *ab-initio* dos reads produzidos pelo sequenciamento 454. Essa montagem será realizada utilizando-se todos os reads gerados por todas as bibliotecas seqüenciadas (pool de mRNA) no qual, após a eliminação dos fragmentos de adaptadores e de seqüências contendo N's, os reads serão montados utilizando-se o software Mira (CHEVREUX et al., 2004).

As análises de expressão gênica diferencial iniciam-se filtrando os reads idênticos do conjunto final, pois esses reads são gerados artificialmente pelo sequenciador e podem causar erros nos cálculos de expressão (NIU et al., 2010). Após essa etapa, os reads de cada biblioteca são alinhados contra o banco de dados de referência usando-se um módulo de alinhamento do software Mira. O cálculo da expressão gênica é realizado contabilizando o número de reads alinhados em cada unigene para todas as bibliotecas. As análises de significância estatísticas serão realizadas pelo software DEGseq (WANG et al., 2010) que é capaz de normalizar e identificar os genes diferencialmente expressos.

Todos os unigenes diferencialmente expressos passam por um processo de anotação automática, para o qual são comparados com diversos bancos de dados biológicos utilizando os softwares Blast (ALTSCHU et al., 1997) e Blast2GO (CONESA et al., 2005). Esta base de dados será disponível somente

à equipe do projeto até que os dados sejam bem explorados e as sequências relacionadas a resistência sejam protegidas de acordo com a Lei de Patentes em vigor.

3.2. Identificação de proteínas diferencialmente expressas durante a interação braquiária x cigarrinha-das-pastagens e que estão envolvidas com a resistência à praga

3.2.1. Material

Duas cultivares de *B. brizantha* que se mostraram contrastantes quanto à resistência à cigarrinha *Notozulia entreciana* serão utilizadas nos ensaios. A cv. Marandu é reconhecida como a principal gramínea resistente à referida praga até o momento. A cv. Arapoty sobressaiu-se em ensaios agrônômicos, sendo registrada pela Embrapa em 2006, mas revelou-se altamente susceptível às cigarrinhas nos locais em que foi avaliada. As cigarrinhas serão coletadas em áreas de pasto da Embrapa Gado de Corte no período das chuvas, época de farta ocorrência da praga na região.

3.2.2. Cultivo das plantas

O cultivo das plantas será realizado em condições controladas, utilizando-se a estrutura disponível na Embrapa Gado de Corte. Sementes de cada cultivar serão germinadas em bandejas distintas, e estas acondicionadas em gaiolas teladas e mantidas em casa-de-vegetação, para evitar a ação de insetos sobre as plantas. Ao atingirem cerca de 10 cm de altura, as mudas serão transplantadas para vasos. Serão preparados 40 vasos para cada cultivar, contendo vinte mudas cada um, e estes serão colocados em uma casa telada, onde serão distribuídos em dois balcões: sobre cada um deles, serão acomodados vinte vasos com mudas da cv. Marandu e outros vinte vasos com a cv. Arapoty. Todos os vasos serão protegidos por uma gaiola telada, a ser fixada na base do balcão. Os vasos receberão irrigação diariamente, até que as mudas atinjam altura aproximada de 35 cm, porte apropriado para o experimento com os insetos, seguindo-se as recomendações de Valério e Nakano (1992).

3.2.3. Infestação das plantas e coleta do material

As plantas das cultivares Marandu e Arapoty distribuídas em um mesmo balcão serão utilizadas para a avaliação da resposta à infestação pelas cigarrinhas, ao passo que os vasos do outro balcão não serão infestados, caracterizando-se como tratamento controle. Cada planta será infestada com 30 fêmeas adultas da cigarrinha *N. entreciana*, coletadas no campo, com reposição diária dos insetos mortos. As plantas infestadas serão monitoradas diariamente, com o propósito de acompanhar visualmente a evolução dos sintomas dos danos causados pelas cigarrinhas. As folhas serão coletadas em quatro pontos após a infestação, sendo esta última coleta coincidente com a observação de sintomas muito expressivos nas plantas, que caracterizam-se por regiões cloróticas localizadas ao redor do ponto de sucção, evoluindo para pontos distantes à medida que se aumenta o tempo de alimentação. As folhas das plantas sadias serão coletadas na mesma ocasião da intervenção nos vasos infestados. À medida que as folhas forem coletadas, estas serão mantidas em nitrogênio líquido (-196°C), para evitar a degradação das proteínas. De volta ao laboratório, as amostras serão devidamente armazenadas a -80°C.

3.2.4. Extração das proteínas e preparação dos géis bidimensionais

Os extratos protéicos serão obtidos de acordo com a metodologia desenvolvida por Hurkman e Tanaka (1986), e modificações propostas por Saravanan e Rose (2004), no qual as proteínas serão solubilizadas em fenol e precipitadas com acetato de amônio em metanol. As proteínas serão quantificadas utilizando-se o Kit Biorad Protein Assay (BioRad), baseado no método de Bradford (BRADFORD, 1976). Os géis bidimensionais serão preparados simultaneamente em pelo menos três repetições para cada tratamento, minimizando assim possíveis variações decorrentes da preparação das amostras, da focalização isoeletrica e da corrida eletroforética da segunda dimensão. Primeiramente, as proteínas serão resolvidas no isofocalizador de proteínas, em fitas de acrilamida com amplo gradiente de pH (pH 3-10), a fim de avaliar regiões com predomínio de spots. Com esta análise, será possível orientar a separação das moléculas em uma faixa restrita de pH, que coincida com regiões de maior abundância, conseguindo-se, desta maneira, aumentar a qualidade da resolução dos géis, como também das informações recuperadas a partir de sua análise. Após a focalização isoeletrica, as fitas serão equilibradas e transferidas para géis de acrilamida, colocados em cubas refrigeradas de eletroforese, para proceder a

eletroforese da segunda dimensão. Em seguida, os géis serão corados com Coomassie Brilliant Blue G-250, de acordo com o protocolo elaborado por Consoli et al. (2001).

3.2.5. Detecção dos *spots* de proteínas e análise estatística

Os géis serão digitalizados no “Image scanner” e suas imagens analisadas pelo programa Image Master™ 2D Platinum. Para cada par de *spots* detectado será determinado o volume relativo médio, com a finalidade de detectar alterações nos níveis de expressão das proteínas em condições contrastantes. O teste estatístico de Student’s será aplicado apenas para os pares de *spots* cuja variação no volume for superior a 30%, visando detectar apenas as proteínas com resposta significativa ao estresse biótico. Somente os *spots* diferencialmente expressos serão recortados do gel e digeridos com tripsina, conforme o procedimento descrito no kit Montage In-Gel Digest (Millipore).

3.2.6. Análise por espectrometria de massa

As amostras contendo fragmentos de proteínas serão analisadas por um espectrômetro de massa, no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A amostra passa pelo primeiro filtro de massas do quadrupolo, que seleciona íons com múltiplas cargas dentre aqueles que apresentaram alta contagem, os quais são fragmentados com gás argônio na célula de colisão, resultando no sequenciamento ordenado dos aminoácidos para cada fragmento peptídico isolado.

3.2.7. Bioinformática

A impossibilidade de acessar diretamente sequências nucleotídicas do genoma de *Bracharia* determina a busca da identidade das proteínas deste gênero por homologia de seqüências com ESTs (*expressed sequence tag*) de outras gramíneas, como arroz, milho, cana-de-açúcar, através da utilização do programa Blast (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*). Para a comparação de seqüências protéicas entre espécies serão utilizados COG (*Clusters of Orthologous Groups*) e INTERPRO (*Integrated Resources of Proteins Domains and Functional Sites*). As microseqüências determinadas experimentalmente também serão submetidas à outra tentativa de identificação, sendo contrastadas com a base de proteínas SWISS PROT através do algoritmo Blastp (*NCBI*).

3.3. Biblioteca de seqüências diferencialmente expressas de *Panicum maximum* em resposta à infecção pelo fungo *Bipolaris maydis*

3.3.1. Material Vegetal

Os genótipos de *P. maximum* utilizados neste estudo serão o acesso PM32, resistente ao *B. maydis* e o capim-tanzânia que é susceptível, ambos disponíveis no germoplasma da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande-MS, e já avaliados quanto à resistência ao fungo. Sementes desses dois genótipos serão desinfetadas mediante imersão em solução comercial de hipoclorito de sódio (2%), por 5 minutos, enxaguando-as abundantemente com seis passagens de água deionizada estéril. Cem sementes serão enfileiradas em caixas esterilizadas, tipo Gerbox, contendo papel germiteste estéreis umedecidos com água deionizada também estéril. Estas caixas serão acondicionadas em BOD em temperatura de 25°C por 72 horas.

Sete dias após a germinação, plântulas de cada genótipo serão transferidas para bandejas contendo areia e vermiculita e depois para vasos contendo uma mistura de solo e areia, mantidas em casa-de-vegetação. Dez plântulas, de cada genótipo, com 45 dias, serão inoculadas com suspensão 8×10^4 /mL de conídios de *B. maydis*, calibrada em câmara de Neubauer (tratamentos). As outras dez plântulas de cada genótipo não serão infectadas (controles). Os isolados do fungo a serem inoculados serão originados de plantas de capim-tanzânia, semeadas nas regiões de Campo Grande-MS, Planaltina-DF e Presidente Prudente-SP. As plantas inoculadas e não-inoculadas serão mantidas em câmara úmida por 72 horas. Serão realizadas coletas nos seguintes períodos: 0h (antes da inoculação) e 24h, 48h e 72h após inoculação. Amostras de folhas serão coletadas dos genótipos inoculados e dos não-inoculados (controles) para a extração de RNA.

3.3.2. Extração de RNA e obtenção do cDNA de folhas de *Panicum maximum*

As folhas coletadas dos dois genótipos, infectados e não-infectados, serão trituradas utilizando nitrogênio líquido, em cadinhos de porcelanas estéreis e tratados com água DEPC, para extração do RNA. Esta será realizada utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, protocolo que já foi testado para a espécie e mostrou-se muito satisfatório pela quantidade e qualidade do RNA obtido.

Após a extração, o RNA total será quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo) e cerca de 4 µg de RNA serão tratadas com DNase I, para remoção total de DNA genômico das amostras, na presença da enzima RNase OUT.

Desse *pool* de RNAs, apenas os mRNAs (RNAs mensageiros) serão convertidos em cDNAs (DNA complementar) utilizando-se a enzima transcriptase reversa e o oligonucleotídeo poli T, seguindo as instruções do fabricante. Os cDNAs também serão quantificados em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo).

3.3.3. Construção das Bibliotecas de cDNA

Os cDNAs provenientes dos genótipos resistente e suscetível infectados serão utilizados como teste (tester) e aqueles advindos das plantas não e não-infectados serão utilizados como controle (driver). A hibridização subtrativa seguida por PCR será conduzida como descrito pelo kit PCR-Select cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences Clontech) e os fragmentos obtidos serão clonados no vetor TOPO TA (Invitrogen). Bibliotecas de cDNA também serão construídas seguindo os procedimentos descritos pelo kit Superscript (Invitrogen).

Os fragmentos clonados serão sequenciados em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems), utilizando os kits apropriados. As sequências serão processadas e analisadas utilizando-se a plataforma computacional desenvolvida pelo consórcio BIOFOCO (<http://www.genoma.embrapa.br>). As sequências obtidas serão submetidas à consulta de similaridade com sequências depositadas no banco de dados GenBank e/ou Gene Index, usando os programas BLASTX e TBLASTX, disponíveis na BLAST Network Service (NCBI, National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.3.4. Análise da expressão pela técnica de RT-qPCR

Sequências que se mostrarem super expressas em plantas infectadas resistentes ao fungo serão alvos de análise em PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). As reações de qRT-PCR serão conduzidas em equipamento Step one ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

A amplificação das sequências-alvo será realizada utilizando-se a metodologia SYBR Green. Primers específicos serão desenhados para essas sequências com auxílio de um programa computacional disponível no próprio equipamento Step one ABI PRISM® 7300. Como referência endógena será utilizado o gene que codifica o RNA 18S. A amplificação das sequências-alvo e do gene de referência endógena será realizada em diferentes tubos, na mesma placa de reação.

A eficiência de cada sistema será avaliada previamente a fim de verificar a amplificação dos genes alvo e a referência endógena. A eficiência do gene é medida pela fórmula: $E = [10^{-1/\text{slope}}] - 1$, onde o slope indica a inclinação da reta, tendo que apresentar um valor próximo de -3,3. Após verificar a eficiência do gene, será escolhida a diluição do cDNA e a concentração dos oligonucleotídeos adequadas para preparar as reações da quantificação relativa. 2 µL da reação da primeira fita do cDNA serão adicionados 0,2 a 0,4 pmoles de cada primer e 12,5 µL do tampão SYBR Green *master mix*, que contém todos os componentes necessários à amplificação (as enzimas uracil N-glicosilase e AmpliTaq Gold, MgCl₂, dNTPs, KCl e o fluoróforo SYBR green), em um volume final de 25 µL. Em cada placa, serão amplificadas amostras controle, que apresentam todos os reagentes necessários à amplificação, exceto DNA. As condições de temperatura serão 50°C por 2 min, para permitir a ação da uracil N-glicosilase, 95°C por 10 min para a

ativação da DNA polimerase e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, seguida de 60°C por 1 min, para anelamento dos primers e amplificação. Ao final dos 40 ciclos de amplificação, um período adicional de 30 min, com elevação gradual da temperatura de 60°C a 94°C, será utilizado para obtenção da curva de dissociação.

A determinação dos níveis de expressão dos genes alvo será realizada pela quantificação relativa utilizando a expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para cada tratamento é detectado o valor de Ct (Cycle threshold), tanto para o gene alvo quanto para o controle endógeno. Este valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. O valor do Ct do gene alvo é subtraído do valor do Ct do controle endógeno, para normalizar a reação. Este valor é utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do controle endógeno, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência.

3.4. Início da construção do mapa genético e mapeamento de QTLs para resistência a antracnose em *S. guianensis*

3.4.1. Material Vegetal

Os genitores contrastantes de *S. guianensis* estão sendo mantidos em casa de vegetação na Embrapa Cerrados. A construção do banco enriquecido de microssatélites será feita a partir do material genético dos genitores, assim como a verificação de polimorfismo destes marcadores. O mapeamento dos microssatélites será feito na população de linhagens F₂, obtidas a partir do cruzamento entre estes parentais divergentes, realizado sob responsabilidade do Dr. Marcelo Ayres, pesquisador da Embrapa Cerrados. Todos os cruzamentos serão realizados através de hibridização artificial e serão mantidos em casa de vegetação na Embrapa Cerrados. Para a construção do mapa genético serão utilizados 220 genótipos F₂ da população de mapeamento e os genitores.

3.4.2. Marcadores moleculares

Serão utilizados no mapeamento aproximadamente 150 marcadores microssatélites para *Stylosanthes guianensis*, polimórficos entre os genitores. Os microssatélites a serem utilizados serão aqueles desenvolvidos durante o projeto Fapesp 2005/52211-9 (SANTOS 2009a) e os que serão desenvolvidos no laboratório neste presente projeto.

Extração de DNA

Amostras de folhas de cada uma das linhagens e dos genitores de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. serão congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e moídas. A extração do DNA será realizada de acordo com a metodologia do CTAB descrita por HOISINGTON et al. (1994).

Amplificação dos marcadores microssatélites

As reações de amplificação serão realizadas com 50 ng de DNA, 1U de *Taq*-DNA polimerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,15 mM de cada dNTP, 0,8µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 1x de tampão da enzima, num volume total de 25 µl. Os produtos amplificados serão visualizados em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio. As condições de amplificação a serem utilizadas serão: 1) 94°C, 1 min; 2) 94°C 1 min; 3) temperatura inferior de 45°C; temperatura específica para cada par de primer por 1 min.; 4) 72°C 1 min, 5) volta ao passo 2 por 30 vezes; 6) 72°C por 5 min.; 7) 15°C, incubação.

Os fragmentos serão visualizados em poliacrilamida 6% e corados com prata de acordo com Creste et al. (2001), para a avaliação do perfil de polimorfismo dos microssatélites nos genitores contrastantes de *S. guianensis* (Aubl.) Sw. a fim de se ter a correta estimativa do índice de polimorfismo de cada marcador. Para o mapeamento da espécie, os produtos da amplificação do DNA dos genitores, e das linhagens recombinantes também serão visualizados em poliacrilamida 6% e corados com prata.

Análise do polimorfismo dos marcadores em *S. guianensis*

Os locos de microssatélites isolados serão caracterizados pelo número de alelos por loco, pela frequência alélica por loco e pelo conteúdo de polimorfismo (PIC) dado pela expressão: $PIC = 1 -$

$\sum_{i=1}^n f_i^2$, onde f_i é a frequência do i -ésimo alelo para uma dada marca, somado ao longo dos n alelos. O

PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório do loco, considerando o número de alelos que são expressos e também as frequências relativas destes alelos.

Construção do mapa de ligação em *S. guianensis*

Os marcadores que serão utilizados no mapeamento devem ser polimórficos entre os genitores e devem apresentar segregação Mendeliana esperada para a progênie. A construção do mapa de ligação será desenvolvida em 3 etapas:

1) Teste de segregação: a segregação Mendeliana será verificada através do teste de Qui-quadrado, pela equação: $\chi^2 = \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$, em que: χ^2 = valor calculado do Qui-quadrado; f_o = frequência observada em

cada uma das classes; f_e = frequência esperada em cada uma das classes (proporção Mendeliana do modelo genético adotado). Os valores obtidos do Qui-quadrado serão comparados com valores tabelados para conclusão sobre a significância desse valor. Um aspecto que deve ser considerado é o nível de significância adotado. Por isso, a correção de acordo com a fórmula abaixo, também será utilizada para resolver situações de erro tipo I, onde são descartadas hipóteses incorretamente: $\alpha = \frac{\gamma}{n}$, em que: α = nível

de significância; γ = probabilidade de se encontrar pelo menos um falso positivo (nível de significância global); n = número de teste independentes, que corresponde ao número de marcadores utilizados).

2) Teste de ligação: o agrupamento dos marcadores será feito adotando-se um valor de limite de detecção (LOD) de 3,0 e uma frequência máxima de recombinação de 40 ($r = 0,40$).

3) Ordenação das marcas: através do método da máxima verossimilhança, o mapa será construído utilizando-se o programa MapMaker. A conversão da frequência de recombinação para centiMorgans (cM) será feita utilizando-se a distância de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944).

Avaliação dos sintomas de antracnose em *S. guianensis*

Para avaliar a resistência à *C. gloesporioides*, uma suspensão de esporos será pulverizada sobre ambas as superfícies das folhas nas plantas com 6-8 semanas de idade. O inóculo será produzido através do cultivo do fungo em meio de extrato de aveia-ágar, onde os isolados serão incubados a 22 °C (± 1 °C), no escuro, durante 8-10 dias. Os sintomas serão avaliados após 7 dias da inoculação e serão classificados numa escala diagramática de notas de 1 a 9 (FERNANDES, 2003).

Identificação e mapeamento dos locos associados a resistência à antracnose em *S. guianensis*

Para o mapeamento, a estimação de seus efeitos genéticos, suas posições e a análise dos efeitos de interação entre QTLs (epistasia), será utilizada a metodologia de Mapeamento por Múltiplos Intervalos (KAO et al. 1999). As análises serão realizadas pelo programa QTL Carthographer. Para verificar a significância dos efeitos e a presença dos QTLs será utilizado o teste da razão de verossimilhança. A seleção de modelo, incluindo ou excluindo os efeitos principais dos QTLs e de epistasia será feita com a utilização da estatística de Critério de Informação Baysiano (*Baysian Information Criterion* – BIC), segundo a recomendação de Zeng et al. (1999).

Ação 4: Avaliação e Seleção de Gramíneas Forrageiras Resistentes às Cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae)

4.1. Avaliação, ajustes e implementação de metodologia de seleção massal de acessos de gramíneas forrageiras quanto à resistência às cigarrinhas-das-pastagens

Justificativa: Na Embrapa Gado de Corte, o programa dirigido para as avaliações de gramíneas forrageiras visando resistência às cigarrinhas-das-pastagens teve início em 1987. Desde aquela ocasião até o presente, os esforços estiveram concentrados na avaliação das centenas de acessos (introduções) provenientes da África. Uma nova etapa está se iniciando, onde os esforços estarão concentrados na

avaliação de milhares de híbridos, oriundos do programa de melhoramento com o gênero *Brachiaria* e com a espécie *P. maximum*. O método atual de avaliação (seleção), em uso na Embrapa Gado de Corte, apresenta limitações quando se considera essa nova demanda. Existe a necessidade urgente de implementação de nova metodologia de avaliação que, sendo mais eficiente, permita que milhares de híbridos passem a ser avaliados anualmente no CNPGC. No CIAT, esta rotina, com metodologia mais eficiente já é realidade. Com esta atividade de pesquisa, objetiva-se avaliar, praticar, promover ajustes e definitivamente implantar, na Embrapa Gado de Corte, a nova metodologia CIAT de avaliação de gramíneas forrageiras visando resistência às cigarrinhas-das-pastagens.

Metodologia: Detalhes sobre esta nova metodologia de avaliação foram apresentados por Sotelo et al. (1998) e Cardona et al. (1999). O texto apresentado a seguir para o item “metodologia”, desta atividade de pesquisa foi transcrito de publicação do CIAT e, por isso é apresentado entre aspas. “Nesta nova metodologia para avaliação de resistência às cigarrinhas, a unidade experimental consiste em um sistema no qual se acoplam duas peças de PVC: uma “união” de 6,5 cm de comprimento e 5,3 cm de diâmetro (que faz as vezes de um pequeno vaso), à qual se acopla uma “redução”, de 3 cm de comprimento e 4,8 cm de diâmetro exterior (e que funciona como tampa). Esta “redução” tem um orifício central de 2,2 cm de diâmetro, através do qual se desenvolve o colmo da planta. Na base da “união”, que é selada provisoriamente com um círculo de filme plástico grosso (preso à peça com fita crepe) – atualmente utiliza-se fundos de copos de isopor descartável -, se coloca uma pequena camada de solo até uma altura aproximada de uns três centímetros. Aí se planta um colmo da gramínea que se deseja avaliar. Após três semanas, depois que a planta já desenvolveu um sistema radicular vigoroso, o sistema é invertido (“cabeça para baixo”), em bancadas ripadas (havendo espaço entre as ripas suficiente para a acomodação das plantas), permanecendo nesta posição por uns dez dias. Este procedimento tem a finalidade de, pela ação do geotropismo positivo, promover a produção de raízes superficiais, que servirão de substrato alimentar para as ninfas da cigarrinha. Para tanto, serão utilizadas luminárias com lâmpadas fluorescentes “Luz-do-dia”, colocadas na parte inferior das bancadas com o objetivo de estimular o crescimento da planta em direção a essa fonte de luz (evitando que se curve buscando a luz natural). Posteriormente, ainda com o sistema invertido, se adiciona o equivalente a 3-4 cm de solo no fundo da “união”. Para fazer espaço que permita a adição desse solo, o conjunto solo e muda enraizada, é empurrado – isso é possível tendo em vista que o fundo da “união”, feito com um círculo de plástico preso com fita crepe, funciona como fundo falso. Após a recolocação do fundo (círculo plástico), o sistema é posto na posição normal, estando pronto para infestação. Quando a “união” e a “redução” são acopladas, o sistema cria um ambiente escuro e úmido adequado para a produção abundante de raízes superficiais, assim como para o desenvolvimento das ninfas. Após os passos descritos anteriormente, cada unidade experimental é infestada com dez ovos de cigarrinhas, obtidos a partir de fêmeas coletadas no campo (no CIAT, as fêmeas são obtidas de criação massal artificial). Os ovos utilizados para a infestação, são aqueles com adiantado desenvolvimento embrionário, ou seja, próximo da eclosão das ninfas. A eclosão das ninfas é verificada nos dias que se seguem à infestação de modo a confirmar que de todos os ovos eclodiram ninfas. Havendo necessidade, alguns ovos são substituídos (corrigindo-se a data de infestação destes) de modo a garantir a uniformidade da infestação. Após completar o período de desenvolvimento ninfal (que varia de acordo com a espécie de cigarrinha e condições ambientais), cada unidade experimental é cuidadosamente examinada para se registrar a sobrevivência das ninfas (que dá informação sobre o mecanismo de resistência denominado antibiose) e para se avaliar o dano causado pelas mesmas, através de nota de dano. Para tal se utiliza uma escala visual com valores entre 1 e 5, sendo 1 ausência de danos, e 5 morte da planta. Esta avaliação de dano permite que se detectem plantas que apresentem tolerância (outro mecanismo de resistência) ao inseto.”

Tal metodologia, segundo informações dos autores mencionados anteriormente, foi testada em várias ocasiões e se mostrou confiável para a seleção de materiais de *Brachiaria* com altos níveis de antibiose às cigarrinhas. Tem permitido, também, detectar tolerância e identificar plantas que combinem ambos os mecanismos de resistência (antibiose e tolerância). Vantagens atribuídas à nova metodologia incluem alta repetibilidade, fácil manejo, ausência de organismos indesejáveis como fungos, bactérias ou insetos, ocupa espaço 80% menor, requer 50% menos tempo para avaliações, muito menos solo e materiais que o método tradicional e que tem sido utilizado na Embrapa Gado de Corte.

A nova tecnologia tem sido adotada nas avaliações rotineiras de acessos de *Brachiaria* em casas de vegetação, no CIAT. Segundo os pesquisadores daquela instituição, com um planejamento de datas de plantio, bem como do manejo da criação do inseto, seria possível avaliar até 2.400 acessos por ano.

A implementação dessa nova metodologia na rotina de avaliações da Embrapa Gado de Corte, permitirá, com mais eficiência, a avaliação de um grande número de acessos, predominantemente híbridos do gênero *Brachiaria* e da espécie *P. maximum* (há, também, a possibilidade de se avaliar acessos do gênero *Paspalum*), envolvendo diferentes espécies de cigarrinhas (*Deois flavopicta*, *Notozulia entrieriana* e *Mahanarva* spp.).

4.2. Desenvolvimento de método para criação de cigarrinha do gênero *Mahanarva* em casa telada

Justificativa: No processo de avaliação de gramíneas forrageiras quanto à resistência às cigarrinhas-das-pastagens, que tem sido conduzido na Embrapa Gado de Corte, conta-se com cigarrinhas provenientes de infestações naturais desses insetos. Apesar de ser uma alternativa conveniente e de baixo custo, nem sempre as cigarrinhas utilizadas (apesar de endêmicas) ocorrem em níveis populacionais suficientes ou mesmo, na ocasião desejada. Esta limitação é ainda mais acentuada no que se refere à cigarrinhas do gênero *Mahanarva*. Trata-se de cigarrinhas associadas às gramíneas de maior porte (capim elefante, cana-de-açúcar) e que tem se constituído praga de extrema importância em áreas de pastagens (em especial pelas fortes evidências de maior capacidade de dano por parte desta espécie de cigarrinha – ação de pesquisa apresentada a seguir). Cigarrinhas do gênero *Mahanarva* foram incluídas apenas recentemente na rotina de avaliações da Embrapa Gado de Corte. Assim, embora estejam sendo possíveis os trabalhos com outras espécies como *N. entrieriana* e *D. flavopicta*, o mesmo não tem ocorrido quando o estudo prevê a avaliação com *Mahanarva* spp. Em várias ocasiões não se encontra, no campo, infestações com esta espécie no momento desejado; por vezes exigindo que todo o processo de preparação de mudas, seja refeito.

Metodologia: Há vários trabalhos na literatura onde são tratados aspectos da criação de cigarrinhas. Alguns, envolvendo espécies de cigarrinhas pragas de cana-de-açúcar (FEWKES e DEMIDECKI-DEMIDOWICZ, 1971; GARCIA, 2002), e outros, cigarrinhas tipicamente de pastagens (MCWILLIAMS e COOK 1975; PACHECO et al. 1982; STORÓPOLI NETO e PAVAN 1984; SOTELO et al. 1988; LAPOINTE et al. 1989a; LAPOINTE et al. 1989b). Nesta atividade de pesquisa, objetiva-se criar, em condições de casa telada, uma espécie típica de cana de açúcar, mas em gramínea forrageira de menor porte. Vários dos trabalhos mencionados apresentam técnicas muito trabalhosas e de difícil implementação. Nesta tentativa de estabelecer a criação de *Mahanarva* spp. na Embrapa Gado de Corte, esforços serão concentrados nos ajustes para a adaptação do método proposto por Lapointe et al. (1989a). Trata-se de método de criação de cigarrinhas típicas de pastagem, mas que se acredita, possa ser ajustado para o caso da criação da cigarrinha do gênero *Mahanarva*. A metodologia original tem a seguinte descrição: **“Obtenção de ovos de cigarrinhas:** Adultos de cigarrinha serão coletados no campo e confinados em câmaras de oviposição. Estas serão feitas de madeira e tela (40x40x80 cm), com piso removível, para se introduzir o substrato de oviposição. No trabalho original menciona-se o uso de solo peneirado numa camada de 0,5 cm de espessura (no CNPGC, utilizar-se-á meio preparado com ágar-água) e aberturas laterais para o fornecimento de alimento, folhas de gramínea (*B. humidicola*), plantada previamente em vasos. No substrato de oviposição serão feitos cortes em forma de retículo de modo a propiciar sítios de oviposição. As fêmeas utilizam as bordas dessas ranhuras no substrato para se alojarem e fazerem a postura. Os insetos permanecerão nestas condições durante uma semana, quando então se retira o substrato de oviposição e, deste, as cigarrinhas mortas. A extração dos ovos do substrato se fará semanalmente mediante lavagens e peneiramentos sucessivos. Os ovos serão separados de eventuais resíduos, por suspensão em solução salina a 30%; e esterilizados superficialmente (desinfetados) com Hipoclorito de Sódio a 2% durante cinco minutos. Posteriormente, serão incubados à temperatura ambiente em Placas de Petri forradas com papel de filtro com umidade de saturação. Os ovos, quando próximo da eclosão das ninfas (nessa ocasião os ovos apresentam a linha do opérculo bem definida, além de ser possível ver através do córion, manchas vermelhas em cada extremidade do ovo), serão reunidos em grupos, em pedaços de papel de filtro úmido, e transferidos às unidades de criação (vasos com plantas). **Criação das ninfas:** As ninfas serão criadas em vasos com plantas de *B. ruziziensis*, alimentando-se de raízes superficiais. O plantio da gramínea será feito de tal forma que permita o desenvolvimento de tais raízes secundárias superficiais. Isto se obtém mediante o enraizamento prévio de mudas trazidas do campo e plantadas em pequenos recipientes de papelão, denominados “Jiffy pots” (no CNPGC, utilizar-se-á copos plásticos descartáveis de 250 mL). Depois de três semanas as plântulas em Jiffy pots serão transferidas para vasos plásticos de 20,5 cm de diâmetro, que conterão solo até $\frac{3}{4}$ de sua capacidade. Para essa operação de transplante, rompe-se o recipiente de papelão (Jiffy pots) e transfere-se a plântula

para o vaso plástico, no qual, previamente, se coloca uma lâmina de filme plástico de 15 cm de diâmetro como barreira para impedir o crescimento vertical e, conseqüentemente, favorecer o crescimento lateral e superficial das raízes. Para garantir alto nível de umidade relativa na região da base da planta, o vaso é coberto com uma tampa de alumínio, pintada de branco, apenas contendo um orifício central para a saída da planta. Adicionalmente, o ambiente escuro gerado por essa tampa, estimula o crescimento de raízes secundárias laterais e superficiais que constituem os locais de alimentação das ninfas. Quando as plantas têm três semanas de transplantadas, apresentam um bom desenvolvimento radicular, ocasião em que serão infestadas, cada uma, com 30 ovos com desenvolvimento próximo da eclosão das ninfas. Estes ovos serão mantidos na casa telada durante todo o período de desenvolvimento ninfal. O piso da casa telada será constantemente irrigado de modo a garantir alta umidade externa, assim como, evitar altas temperaturas. **Obtenção das cigarrinhas adultas:** Por ocasião do término do período ninfal, quando as ninfas estiverem próximas de se transformarem em cigarrinhas adultas, os vasos com as ninfas, serão transferidos para as câmaras de emergência (subdivisão da casa telada). A coleta dos adultos emergentes se fará mediante a remoção das tampas de alumínio e retirada do inseto, aproveitando o fato de que a cigarrinha adulta permanece dentro da espuma ninfal durante algumas horas. Isto permite sexá-los e transferi-los para as câmaras de oviposição, para dar seqüência ao ciclo da criação. Os adultos assim obtidos poderão ser, também, utilizados em experimentos que exijam controle de idade e um dos sexos em particular.” Em se mantendo a criação da cigarrinha *M. fimbriolata* na Embrapa Gado de Corte, da câmara de oviposição, poder-se-á obter a quantidade de ovos necessária para os diferentes ensaios de avaliação e seleção de gramíneas resistentes. Esta metodologia será utilizada como ponto de partida e todos os ajustes serão testados, assim como a adequação do ambiente de trabalho (casa de tela) de modo a permitir que se instale na rotina de trabalho do laboratório de entomologia de forrageiras da Embrapa Gado de Corte, uma criação massal dessa importante cigarrinha.

4.3. Comparação dos danos causados pelas cigarrinhas *Mahanarva* spp., *Deois flavopicta* e *Notozulia entreriana*.

Justificativa: Cigarrinhas do gênero *Mahanarva*, insetos predominantemente associados com a cana-de-açúcar [bem como às gramíneas de grande porte, como o capim elefante (*Pennisetum purpureum*)], adquiriram status de praga em áreas extensivas de pastagens. Além de gramíneas reconhecidamente suscetíveis, estes insetos tem ameaçado pastagens estabelecidas com gramíneas até então consideradas resistentes às cigarrinhas, como, por exemplo, *B. brizantha* cv. Marandu. Tornou-se necessário, então, a inclusão de cigarrinhas desse gênero nos estudos de avaliação e seleção de gramíneas resistentes às cigarrinhas; estudos até então, restritos às cigarrinhas típicas de pastagens. Não só para melhor caracterizar a importância dessa cigarrinha, mas também para dispor de informações que permitam melhor calibrar as infestações artificiais nos diversos testes (em especial nos testes onde se mede o percentual de sobrevivência ninfal, assim como nos testes onde se mede danos – testes rotineiros na Embrapa Gado de Corte), julga-se de grande importância comparar a capacidade de dano de cigarrinhas do gênero *Mahanarva* com as duas espécies mais comuns em pastagens, *N. entreriana* e *D. flavopicta*.

Metodologia: As comparações quanto à capacidade de dano de adultos de cigarrinhas, serão conduzidas envolvendo três espécies de cigarrinhas (*Mahanarva* sp., *N. entreriana* e *D. flavopicta*) em três plantas hospedeiras, apresentando, cada uma, um mecanismo de resistência próprio (*B. decumbens* cv. Basilisk, como planta suscetível; *B. humidicola*, como planta resistente por tolerância e; *B. brizantha* cv. Marandu, como planta resistente por antibiose). Para cada gramínea serão utilizados 40 vasos (capacidade 2 kg de solo), formando dez grupos de quatro plantas, uniformes sob o ponto de vista de produção de matéria seca, dentro dos quais será feita a aleatorização dos tratamentos (T1: *N. entreriana*, T2: *D. flavopicta*; T3: *Mahanarva* sp. e T4: Controle, sem infestação). As plantas serão estabelecidas a partir de sementes, restringindo-se o número de dez plantas por vaso. Em torno dos 60 dias após a semeadura, as plantas serão uniformizadas a 35 cm e infestadas com 10 adultos de cigarrinhas (exceto no tratamento controle) durante 10 dias. Haverá reposição diária dos insetos mortos. Utilizar-se-ão cigarrinhas coletadas no campo. Somente um dos sexos (fêmeas) será utilizado, uma vez que fêmeas e machos diferem na intensidade dos danos que causam (Valério 1995). Ao final deste período, os insetos serão removidos e se farão as seguintes observações: a - avaliação do dano em correspondência aos níveis observados de clorose (sintoma típico da cigarrinha), para cada planta aos 14 dias após o início do teste, através de medidor de clorofila portátil SPAD meter Minolta 520; b - após se avaliar os danos com o SPAD meter, as plantas terão suas alturas medidas, e em seguida, serão novamente uniformizadas a 35 cm. Da porção cortada, denominada “Rebrote”, será obtido

o peso seco e que indicará a redução imposta pelo mesmo número de cigarrinhas na produção de matéria seca das diferentes plantas. Esta ação de pesquisa será conduzida de acordo com um delineamento de parcelas subdivididas, sendo o primeiro fator constituído das três forrageiras, que será testado contra a variação da resposta entre as parcelas, e o segundo fator, constituído pela infestação (ou não) com as diferentes espécies de cigarrinhas; este será testado contra variação dentro de parcela. Em caso de se constatar heterogeneidade de variância da resposta entre as três forrageiras, a análise ficará restrita a cada gramínea de acordo com um delineamento em blocos ao acaso. Os efeitos significativos de tratamento serão desdobrados de acordo com o Teste Student-Newman-Keuls, usando SAS.

4.4. Seleção de acessos de gramíneas forrageiras resistentes às cigarrinhas-das-pastagens

Justificativa: A busca por gramíneas alternativas deve ser uma constante, principalmente para a composição de um quadro mais diversificado no contexto da exploração. Ao se liberar no futuro, novas cultivares que além das características agrônômicas desejáveis, apresentem também, razoável (se não elevado) grau de resistência às cigarrinhas, estar-se-á oferecendo aos produtores uma alternativa de controle. Esta será, pelas boas qualidades da forrageira, de fácil adoção, e também de baixo custo, uma vez que o controle estará sendo efetivado simplesmente através da aquisição das sementes.

Metodologia: Representa um teste de grande importância, tendo em vista que certas características morfológicas e/ou fisiológicas de algumas plantas podem interferir negativamente no desenvolvimento, reduzindo a sobrevivência de ninfas, resultando numa diminuição de população. Tais características se referem a um mecanismo de resistência denominado Antibiose. A atividade será desenvolvida em casa de vegetação do setor de Entomologia de Forrageiras Tropicais da Embrapa Gado de Corte. Híbridos de *Brachiaria* e de *P. maximum* obtidos pelo programa de melhoramento genético de gramíneas forrageiras da Embrapa Gado de Corte serão avaliados quanto à resistência às cigarrinhas-das-pastagens *Notozulia entreiriana*, *Deois flavopicta* e *Mahanarva* sp. através dos parâmetros sobrevivência e duração do período ninfal. Cultivares comerciais dessas gramíneas serão utilizadas com testemunhas. As plantas serão propagadas através de mudas e mantidas em vasos plásticos com capacidade para 3 L. As adubações serão realizadas no plantio, utilizando-se 3 g/vaso da fórmula 04-32-10 e um mês após o plantio, utilizando-se uréia na proporção de 3 g/vaso. Estas plantas ao atingirem dois meses de idade serão utilizadas como fonte de material vegetativo para a realização das avaliações. Adultos das cigarrinhas serão coletados no campo e confinados em câmaras de oviposição, seguindo metodologia proposta por Valério (1993b). Como substrato de oviposição, se utilizará solução ágar-água (12 g/L). A extração dos ovos será mediante lavagens e peneiramentos sucessivos em água corrente. Os ovos extraídos do substrato de oviposição serão desinfetados em solução de Hipoclorito de Sódio a 2 %. Posteriormente, serão lavados em água destilada, acondicionados em placas de Petri contendo papel filtro em umidade de saturação e mantidos em câmara climatizada a 27°C. Os acessos serão avaliados em grupos anualmente, num ensaio com delineamento inteiramente casualizado com dez repetições. Cada parcela será constituída de um vaso plástico ($\varnothing = 17$ cm, altura 17,5 cm) com capacidade para 2,5 kg de solo, contendo 3-4 plantas. Tais plantas serão propagadas através de mudas em copos plásticos, dois meses e meio antes do início do teste. Após o pegamento das mudas, estas serão transferidas para os vasos, os quais serão tampados (com uma abertura central para a saída das plantas) com tampa de alumínio. Tal procedimento visa, de um lado, estimular a emissão de raízes superficiais, as quais são importantes para garantir a sobrevivência das ninfas recém eclodidas e, de outro, prover um ambiente de menor aeração e luminosidade e maior umidade às ninfas. Esta tampa de alumínio permitirá que as ninfas encontrem condições de desenvolvimento próximas às condições de campo. Serão colocados cinco ovos prestes a eclodir em cada repetição que será então engaiolada individualmente de sorte a se obter os adultos que emergirão. Os adultos serão retirados diariamente, sexados e armazenados em freezer para posterior obtenção do peso seco. O peso do adulto dá uma indicação da maior ou menor adequação da planta hospedeira. De plantas hospedeiras mais adequadas emergem adultos mais pesados. Interessa-nos, portanto, conhecer neste teste o número de ninfas que atingem a fase adulta (sobrevivência), a duração do período ninfal e o peso seco de fêmeas. Ao longo do teste as plantas serão regularmente irrigadas e adubadas. Serão anotados, através do termohigrógrafo, os dados de temperatura e umidade.

h) principais contribuições científicas ou tecnológicas da proposta, com ênfase nos benefícios esperados para a Região Centro-Oeste;

Várias serão as contribuições científicas, tecnológicas e de inovação geradas com a realização do projeto, uma vez vários resultados obtidos possibilitarão a geração de novas cultivares a serem lançadas para a região Centro-Oeste e outras regiões do Brasil. A instituição coordenadora desta proposta tem vasta experiência neste propósito, pois os seus Programas de Melhoramento de *Brachiaria* spp., *Panicum maximum* e de *Stylosanthes* spp. são consolidados. Como exemplo, pode-se citar que cerca de 90% das sementes de forrageiras produzidas anualmente no Brasil, cuja comercialização ocorre nos mercados internos e externo, são de cultivares lançadas pela Embrapa Gado de Corte. Várias publicações serão geradas e, o mais importante, vários estudantes da região serão qualificados com a realização do projeto.

Os produtos ou processos que serão gerados, caso pertinente, serão submetidos a processos de propriedade intelectual e serão patenteados pela Embrapa.

i) orçamento detalhado, incluindo previsão de participação de reuniões internas de acompanhamento e integração dos projetos da Rede;

100mM dNTPs Set (dATP-dCTP-dGTP-dTTP) (4x25uM)	6	980,00	5.880,00
Ácido acético P A fr. c/ 1 L	1	16,00	16,00
Ácido Bórico Frasco 500 g	6	87,50	525,00
Acrilamida 500g	2	500,00	1.000,00
Adubo granulado	2	50,00	100,00
Adubo líquido Ouro Verde	5	20,00	100,00
Ágar-ágar-puro	6	600,00	3.600,00
Agarose Frasco 500 g	4	1.476,00	5.904,00
Água sanitária (L)	24	1,90	45,60
Álcool comercial	30	4,00	120,00
Álcool etílico P.A. 99,5 %	4	12,50	50,00
Alfinete entomológico nº 0	1	100,00	100,00
Alfinete entomológico nº 1	1	100,00	100,00
Alfinete entomológico nº 2	1	100,00	100,00
Alfinete entomológico nº 3	1	100,00	100,00
Algodão hidrófilo (500 g)	6	12,00	72,00
Antibiótico Sulfato de Estreptomicina (25 g)	1	98,00	98,00
Areia lavada (m³)	5	90,00	450,00
Aveia flocos finos Quacker (500 g)	3	7,50	22,50
Baldes plásticos reforçados (15L)	4	10,00	40,00
Bandeja plástica (50x30x10cm)	50	9,00	450,00
Bastão de vidro (8 mm)	10	2,30	23,00
BDA - batata, dextrose e agar (500 g)	2	120,00	240,00
Becker graduado vidro (500mL)	25	9,00	225,00
Bico para aspersores	100	6,00	600,00
Bis-acrilamida 250g	2	108,00	216,00
Bobina de papel Kraft New 60 cm (rolo)	1	30,00	30,00
Bomba d'água para resfriadores casa de vegetação	1	370,00	370,00

Borracha branca com cinta Mercur	10	0,75	7,50
Bucha de redução 50x20mm (a ser usada como tampa da unidade experimental de seleção)	1.000	2,30	2.300,00
Cabos de madeira para redes entomológicas	10	2,00	20,00
Caixa plástica (± 28,5 cm x 18,5 cm x 10,0 cm)	40	30,00	1.200,00
Calcário dolomítico (t) - campo e casa-de-vegetação	6	100,00	600,00
Calcário dolomítico ultrafino - sementes	1	250,00	250,00
Câmara de Neubauer	3	180,00	540,00
Câmara de Peters	3	180,00	540,00
Canamicina (frasco de 5 g)	2	377,60	755,20
Caneta BIC azul cristal/preta/vermelha	30	0,50	15,00
Canetas para plástico e vidro	15	1,50	22,50
Canetas para quadro branco e papel (ponta porosa)	15	3,50	52,50
Cartucho para impressora Jato de tinta (preto)	30	20,00	600,00
Cartucho para impressora jato de tinta colorido	10	20,00	200,00
Cd regravavel	30	2,35	70,50
Clorofórmio L	10	68,00	680,00
Cola Tenaz (90g)	3	1,90	5,70
Combustível (L) diesel	2500	2,10	5.250,00
Combustível (L) gasolina	2550	2,70	6.885,00
Copo descartável (50 mL, com 100)	2	2,00	4,00
Copo descartável (500 mL, com 100)	10	5,00	50,00
Copo plástico 300 mL	10	8,00	80,00
CTAB Frasco 500 g	2	780,00	1.560,00
DEPC (dietilpirocarbonato)Frasco com 100 mL	1	1.000,00	1.000,00
Detergente doméstico	24	1,10	26,40
Dextrose alimentar (500g)	11	17,00	187,00
DNase I Frasco com 100 unidades (1U/uL)	1	989,00	989,00
EDTA Frasco 250 g	4	319,00	1.276,00
Elástico Mamuth super resistente (cx 25 g)	6	2,00	12,00
Envelope pardo (8x11cm) - mil	5	40,00	200,00
Enxada tramontina 2,5 libras com cabo	8	25,00	200,00
Enzima DNA Polimerase I Klenow Fragment	5	571,70	2.858,50
Enzima DNA Polimerase Tubo	10	185,00	1.850,00
Enzimas modificadoras e de restrição	1	11.000,00	11.000,00
Erlenmeyer 1000mL	5	20,00	100,00

Escova para Limpeza Interna de Tubos de Ensaio e Provetas	3	4,00	12,00
Espátula com colher, Chapa de aço inox 304 com 15 cm de comprimento	2	10,00	20,00
Espanjas para limpeza Scotch (pcte com 3)	10	4,00	40,00
Espuma de látex (2 m x 3 cm de espessura) (para unidade experimental de seleção)	10	15,00	150,00
Etanol L	20	47,60	952,00
Etiqueta adesiva para impressão (usadas na identificação das unidades experimentais)	5	15,00	75,00
Fertilizantes químicos (diversos), macro e micronutrientes – campo e casa-de-vegetação	1	3.000,00	3.000,00
Filme plástico transparente com 1,5 de largura (para unidade experimental de seleção)	10	10,00	100,00
Filme PVC transparente	20	5,00	100,00
Fita crepe 3M (19mmx50m)	60	2,15	129,00
Fita durex 12X30 500 BOPP 3M	5	1,10	5,50
Formicida Isca granulada	10	15,00	150,00
Fungicidas diversos	1	1.000,00	1.000,00
Garfo com 4 dedos reto com cabo	4	20,00	80,00
Gaze hidrófila 100% algodão não esterilizada (9 fios/cm ² – rolo 340g)	5	55,00	275,00
Glossy paper	5	25,00	125,00
Grampos (106 x 4mm; 106 x 6mm e 106 x 8 mm)	3	7,00	21,00
Grampos para grampeador (cx)	2	3,90	7,80
Herbicidas diversos	1	1.000,00	1.000,00
Inseticidas diversos e acaricidas	1	1.000,00	1.000,00
Isopropanol L	20	55,90	1.118,00
Jaleco para utilização em laboratório	4	30,00	120,00
Kit p/ extração de DNA plasmidial	5	582,00	2.910,00
Kit p/ extração e purificação de RNA	3	900,00	2.700,00
Kit para síntese do cDNA	1	15.000,00	15.000,00
Kit plástico para hidroponia com 10 linhas e 180 furos (a ser utilizado no estabelecimento das mudas das plantas a serem avaliadas)	1	580,00	580,00
Kits para clonagem gênica	1	10.000,00	10.000,00
Ladders 100 bp e 1Kb	4	950,00	3.800,00
Lâminas para Bisturi n° 24	1	30,00	30,00
Lâminas para microscopia lisa lapidada (cx com 50)	15	3,50	52,50
Lamínula de vidro 24 x 24mm (cx com 100)	15	4,00	60,00

Lâmpada com refletor espelhado para microscópio estereoscópico	2	35,00	70,00
Lâmpada fluorescente de 20W – luz negra	12	47,90	574,80
Lâmpada fluorescente de 40W	30	4,00	120,00
Lâmpada fluorescente H9 - 110V	30	12,00	360,00
Lâmpada germicida UV G13/T8-15 Watts220V	3	60,00	180,00
Lâmpada para microscópio 6V/15W	2	70,00	140,00
Lápis preto nº 2 Faber Castell	30	0,38	11,40
Lápis tinta para papel mata borrão	10	3,00	30,00
Lona plástica 5m x 5m (preparo de solo)	4	35,00	140,00
Luva de procedimento tam. G (com 100)	2	20,00	40,00
Luva de procedimento tam. M (com 100)	4	20,00	80,00
Luva de procedimento tam. P (com 100)	4	20,00	80,00
Lysoform	5	10,00	50,00
Macroelementos individuais - sementes	1	500,00	500,00
Madeira e tintas para confecção de estacas	1	500,00	500,00
Mangueira de jardim para regar (rolo 30 m)	3	70,00	210,00
Máscara flexível para pó (com 100)	1	8,00	8,00
Material de expediente	1	300,00	300,00
Material descartável (placas, luvas, microtubos, ponteiros, etc) para análise smoleculares	1	10.000,00	10.000,00
Membrana de parafilme (tipo Marathon)	1	300,00	300,00
Microdubos 0,2 mL Pcte 1000 unidades	40	50,00	2.000,00
Microelementos individuais - sementes	1	300,00	300,00
Microtubos 1,5mL Pcte 1000 unidades	20	50,00	1.000,00
Óleo mineral nujol L	3	155,00	465,00
Outros materiais de campo (não contemplados)	1	600,00	600,00
Outros materiais de escritório (não contemplados)	1	200,00	200,00
Outros materiais de laboratório (não contemplados)	1	600,00	600,00
Papel A4 (resma)	12	10,45	125,40
Papel A4 Alcalino para impressora Jato de tinta	12	13,00	156,00
Papel alumínio (7m)	10	5,00	50,00
Papel filtro 11 cm diâmetro	10	6,00	60,00
Papel filtro 15 cm diâmetro	10	8,00	80,00
Papel toalha de 3 dobras (pacote com 1250 f)	8	25,00	200,00
Parafilm "m" 10,2cm (4") largura x 38,1m (125ft)	1	90,00	90,00
Peneira granulométrica 3"x2" inox malha 500	2	146,00	292,00
Peneira granulométrica 8"x2" inox malha 200	2	120,00	240,00

Peneira granulométrica 8"x2" inox malha 400	2	217,00	434,00
Peneira granulométrica 8"x2" inox malha 500	1	272,00	272,00
Peneira granulométrica 8"x2" inox malha 60	1	115,00	115,00
Persulfato de amonia 25g	2	49,00	98,00
Pinça média (12 cm) ponta reta	2	18,00	36,00
Pinça para relojoeiro ponta fina	10	15,00	150,00
Pinça para relojoeiro ponta grossa	10	15,00	150,00
Pipeta Pasteur (plástica) (com 100)	1	35,00	35,00
Pisseta plástica	10	3,90	39,00
Placas de Petri	100	4,00	400,00
Polvilhadeira guarany para o controle de formigas	2	17,00	34,00
Ponteiras c/ filtro barreira P10 Pcte 1000 unidades	30	152,60	4.578,00
Ponteiras c/ filtro barreira P20 Pcte 1000 unidades	30	152,60	4.578,00
Ponteiras c/ filtro barreira P200 Pcte 1000 unidades	30	132,60	3.978,00
Ponteiras P10 Pcte 1000 unidades	100	32,00	3.200,00
Ponteiras P1000 Pcte 1000 unidades	40	34,00	1.360,00
Ponteiras P200 Pcte 1000 unidades	100	32,00	3.200,00
Proveta de vidro 100 ml graduada	8	6,40	51,20
Proveta graduada, vidro, 1000 mL	5	29,00	145,00
Pulverizador costal Jacto – 20L (1 para herbicida e 1 para inseticida)	2	230,00	460,00
Pulverizador manual de pressão capacidade 4 L (tipo Jacto, Burden, Guarany)	1	85,00	85,00
Pulverizador manual para inoculação	20	20,00	400,00
Rastelo comum com cabo	3	20,00	60,00
Reagentes para microscopia eletrônica (resinas, fixadores, etc)	1	7.000,00	7.000,00
Reagentes para purificação e eletroforese de ácidos nucléicos (agarose, marcadores de peso molecular, sais, solventes orgânicos, kits, etc)	1	7.000,00	7.000,00
Reagentes para tratamento e purificação do RNA total	1	8.000,00	8.000,00
Reagentes, materiais plásticos para extração do RNA total	1	9.000,00	9.000,00
Recarga de cilindro de CO ₂ para pulverizador	20	25,00	500,00
Rede entomológica	10	25,00	250,00
Reverse Transcriptase	4	1.099,00	4.396,00
RNASE Away Frasco c/ 250mL	10	189,50	1.895,00
RNase H Frasco com 30 unidades (2U/uL)	2	503,00	1.006,00
Sabonete líquido	8	4,00	32,00

Saco branco chão	20	5,00	100,00
Saco plástico (três dimensões diferentes)	30	9,00	270,00
Sacos de ráfia	500	2,00	1.000,00
Síntese de primers 25mM	200	85,00	17.000,00
Softwares Windows 7 e office 2007	4	350,00	1.400,00
Sulfato de estreptomicina fr. 25g	2	55,6	111,20
Tela de nylon com 1,5 m de largura	50	10,00	500,00
Temed 50mL	2	167,00	334,00
Termômetro de máxima e mínima	2	40,00	80,00
Tesoura comum	2	15,00	30,00
Tesoura de poda	4	30,00	120,00
Tinta guache	1	2,00	2,00
Tinta plástica	1	2,70	2,70
Trena de 50 metros	2	50,00	100,00
Tris Base (frasco 1Kg)	3	317,00	951,00
Trizol Frasco c/ 100 mL	5	580,00	2.900,00
Tubo de ensaio (15x160 mm) tampa rosqueável	50	1,75	87,50
Tubo de ensaio scott (12x100mm) com tampa	100	1,90	190,00
União PVC 50 mm NBR 5648 (a ser usada como base da unidade experimental de seleção)	1.000	2,20	2.200,00
Vasos de plástico cap. 2,5L	1000	5,00	5.000,00
Vassoura piaçava com cabo	20	6,50	130,00
Vermiculita (pcte)	10	25,00	250,00
Vidraria	1	8000,00	8.000,00

230.424,90

Passagens e Diárias	Valor unitário (R\$)	Quantidade	Valor total (R\$)
Passagens para 5 pesquisadores do projeto para participarem de Workshop anual de apresentação de resultados parciais de pesquisa realizada (local Campo Grande-MS)	750,00	15	11.250,00
Passagens para o coordenador do projeto visitar experimentos e discutir estratégias de pesquisa com os coordenadores locais de atividades em MT, GO e DF (uma viagem por ano/local)	750,00	6	4.500,00
Diárias no país para a coleta de amostras e avaliações de experimentos e reuniões anuais dos participantes do projeto	187,83	130	24.417,90

40.167,90

CAPITAL	Quantidade	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
----------------	-------------------	-----------------------------	--------------------------

Banho-seco para digestão enzimática Termomixer comfort com bloco para 24 tubos de 1,5 ml (Eppendorf) importação direta – já incluído 18%	1	7140,00	7.140,00
Câmara para Germinação de Plantas e Sementes (Inc. tipo B.O.D. com Fotoperíodo e alternância de temperatura)	1	7000,00	7.000,00
Concentrador de proteínas com rotor fixo para 48 tubos (Eppendorf) importação direta – já incluído 18%	1	16800,00	16.800,00
Digitalizador de imagem ImageScanner III (GE Healthcare) +Software Image Master 2D Platinum (GE Healthcare) para a análise computacional dos géis bidimensionais.	1	28560,00	28.560,00
Espectrofotômetro Biophotometer plus (Eppendorf) importação direta – já incluído 18%	1	9010,00	9.010,00
Estação de ultrapurificação de água por importação direta	1	9000,00	9.000,00
Estufa de Secagem e Esterilização Fanem Modelo 315 SE	1	3000,00	3.000,00
Refrigerador para armazenamento de amostras	1	2200,00	2.200,00
Material bibliográfico			5.500,00
Microcentrífuga MiniSpin para 12 tubos (Eppendorf) importação direta – já incluído 18%	1	3150,00	3.150,00
Microcentrífuga Refrigerada para análises moleculares	1	20000,00	20.000,00
Microcomputador de alta capacidade para análise por bioinformática	1	6000,00	6.000,00
Microcomputador Intel Core i5-750 2.66GHz 8MB cache - Placa mãe Intel BOXDP55WB S/R Giga LGA1156 - Core i5 Série 750 e Core i7 Série 800, Chipset Intel P55, FSB 1333MHz, 4 DDR3 1066/1333Mhz (até 16GB), 1 PCI-e x16, 1 PCI-e x1, 1 PCI, 6 SATAII RAID: 0, 1, 5, 10 & Matrix, 8+6USB 2.0, Firewire: 2 (1 externo / 1 interno). (sem PS/2, serial e paralela). Memória DDR3 4GB (2x2048MB) kingston, HD 1000 GB SATA2 7200 RPM, Placa vídeo 1024MB GeForce GT240 PCI Express PCI DDR3 VGA+DVI+HDMI HDTV SLI 128BIT, R-VGA-150930-SD3, Gabinete 4 baias, Kit Teclado e Mouse Óptico Microsoft, Pad Mouse. Monitor	3	3000,00	9.000,00
Micropipetas de volume variável (Eppendorf) para manipulação de RNA importação direta – já incluído 18%	3	1000,00	3.000,00
No-break para computador	3	300,00	900,00
No-break para ultracentrífuga	1	10000,00	10.000,00
Sistema de captura de imagem a partir de microscópio e lupa e digitalização da imagem em computador (software incluído)	1	18500,00	18.500,00
Ultrafreezer (-68°C) 368 Litros	1	32000,00	32.000,00

190.760,00

SERVIÇOS DE TERCEIROS PESSOA JURÍDICA	Valor (R\$)
Pirosequenciamento 454 de 04 placas (corrida de 02 placas de cada espécie) contendo o cDNA de todos os tratamentos considerados. Este serviço será executado pelo Laboratório Nacional de Computação Científica, em Petrópolis-RJ (http://www.ugc.lncc.br)	110.000,00
Construção de um telado tipo viveiro (12,80 m x 13,50 m x 3,00 m) com 172,80 m ² . Estrutura em perfis de aço galvanizados, com mureta de concreto em seu perímetro e cobertura com tela clarite com malha de 1mm.	24.652,00
Encargos de importação direta	1.800,00
Sequenciamento de DNA	8.600,00

Serviços de Manutenção de casas-de-vegetação e equipamentos de laboratório	35.000,00
--	-----------

R\$ 180.052,00

Modalidade	Duração	Quantidade de bolsas	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Mestrado - GM	24	2	1.200,00	57.600,00
Apoio Técnico AT - NS	36	1	550,00	19.800,00
Apoio Técnico AT - NS	24	1	550,00	13.200,00
Apoio Técnico AT - NM	36	1	400,00	14.400,00
Desenvolvimento Tecnológico e Industrial - DTI C	36	1	1.100,00	39.600,00
Desenvolvimento Tecnológico e Industrial - DTI B	36	1	3.000,00	108.000,00
TOTAL				252.600,00

j) cronograma físico-financeiro;

Atividades	Ano I		Ano II		Ano III		Total
	1	2	3	4	5	6	
Seleção de genótipos/cultivares de <i>Brachiaria</i> , <i>Panicum</i> e <i>Stylosanthes</i> para resistência de fungos e nematóides	69752,98	30008,33	34410,9	37952,98	35327,98	37952,98	245406,15
Genes e proteínas de forrageiras envolvidos na resistência a estresses bióticos	200.287,75	136.881,60	53.294,65	22.600,00	47.919,65	22.600,00	483.583,65
Identificação de vírus e fitoplasmas ocorrentes em forrageiras tropicais	64.208,35	12.933,33	12.933,33	12.933,33	12.933,33	12.933,33	128.875,00
Avaliação e Seleção de Gramíneas Forrageiras Resistentes às Cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae)	35.433,50	7.400,00	8.406,50	6.400,00	6.400,00	6.400,00	70.440,00
Total	369682,58	187223,26	109045,38	79886,31	102580,96	79886,31	928304,8

k) disponibilidade efetiva de infraestrutura e de apoio técnico para o desenvolvimento do projeto;

A contrapartida da Embrapa e demais instituições envolvidas para a execução deste projeto refere-se à infra-estrutura que as mesmas oferecem em termos de Laboratórios especializados, dotados da maioria dos equipamentos necessários para a execução das ações de pesquisa previstas. Assim, está sendo requisitado ao CNPq apenas parte dos equipamentos que serão necessários, como também recursos para custeio, com disponibilidade restrita. Para a instalação dos experimentos de campo, área, máquinas e mão-de-obra serão disponibilizadas, tanto pela Embrapa Gado de Corte quanto pelas demais instituições parceiras. Além dos pesquisadores envolvidos no projeto, pessoal de apoio qualificado estará disponível para auxiliar na instalação e avaliação dos experimentos. As instituições envolvidas, sobretudo a Embrapa Gado de Corte, também oferecerão os serviços de correios, internet e de telefonia, assim como acervo bibliográfico para consultas.

I) identificação dos demais participantes do projeto, descrevendo as atividades de cada um deles;

Pesquisadores	CPF	Titulação	Instituição	Atividades desenvolvidas no projeto
Alexei Dianese	561.235.821-00	Doutor	Embrapa Cerrados	Prospectar genótipos vegetais de forrageira com resistência natural a vírus transmitidos mecanicamente.
Anete Pereira de Souza	067.606.548-11	Doutora	UNICAMP	Análises de SSR e mapeamento de QTLs de resistência a Antracnose em <i>S. guianensis</i> e início da construção do mapa de ligação para a espécie
Cacilda Borges do Valle	754.853.708-53	Doutora	Embrapa Gado de Corte	Responsável pelo estabelecimento e manutenção da coleção e produção de híbridos do gênero <i>Brachiaria</i> na Embrapa Gado de Corte.
Carlos Alberto Labate	261.503.366-20	Doutor	ESALQ-USP	Colaborador nas atividades de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Professor do Departamento de Genética da Esalq/USP
Carlos Bloch Junior	262.172.871-53	Doutor	Embrapa Gado de Corte	Colabor disponibilizando a infra-estrutura de seu Laboratório para as análises por espectrometria de massa. Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Área: Espectrometria de Massa.
Carolina Vianna Morgante	272.067.818-02	Doutora	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia	Participa como consultora nas etapas de preparação de amostras para sequenciamento. Pós-doc da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Área: Biotecnologia Vegetal.
Celso Fernandes Dornelas	453.918.316-87	Doutor	Embrapa Gado de Corte	Coordenação do subprojeto e execução de ensaios de resistência de plantas forrageiras a doenças
Cláudio Takao Karia	104.136.878-05	Doutor	Embrapa Cerrados	Avaliação de <i>Stylosanthes guianensis</i> para resistência à antracnose
Daniel Cassetari Neto	345.851.336-15	Doutor	UFMT	Coordenação do subprojeto e execução de ensaios de epidemiologia e manejo de doenças em forrageiras
Eduardo Alano Vieira	999.533.669-34	Doutor	Embrapa Cerrados	Prospectar genótipos vegetais de forrageira com resistência natural a vírus transmitidos mecanicamente.
Fabricia Z. V. Torres	900.117.241-53	Doutora	Embrapa Gado de Corte	Implementação novo método de avaliação massal de acessos de gramíneas visando resistências às cigarrinhas.
Francisco Prosdocimi de Castro Santos	039.168.136-25	Doutor	UFMT	Estudos de epidemiologia e manejo de doenças em forrageiras
Gonçalo Amarante Guimarães Pereira	289.870.395-87	Doutor	UNICAMP	Análises das sequências obtidas do sequenciamento dos cDNAs diferencialmente expressos
Jaime Maia dos Santos	197.376.296-04	Doutor	UNESP-Jaboticabal	Hospedabilidade de plantas forrageiras à <i>Pratylenchus brachyurus</i> e a eficiência do controle biológico com uso de <i>Trichoderma harzianum</i>
Jaqueline R. Verzignassi	080.351.768-89	Doutora	Embrapa Gado de Corte	Avaliação de <i>Brachiaria</i> para resistência à mela das sementes
José Raul Valério	220.984.026-00	Doutor	Embrapa Gado de Corte	Avaliação e seleção de gramíneas forrageiras resistentes às cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae)
José Ribamar N. dos Anjos	060.171.851-87	Doutor	Embrapa Cerrados	Descrever a etiologia de potenciais doenças virais ocorrentes em forrageiras tropicais.
Karem Guimarães Xavier Meireles	992.555.886-72	Doutora	Embrapa Gado de Corte	Desenvolvimento de ESTs e busca de genes em gramíneas forrageiras envolvidos na resistência à estresses bióticos a partir de dados gerados por pirosequenciamento massal Identificação de proteínas diferencialmente expressas durante a interação braquiária x cigarrinha-das-pastagens e que estão envolvidas com a resistência à praga.

Letícia Jungmann Cançado	809.882.961-87	Doutora	Embrapa Gado de Corte	Extrações de DNA e análises com marcadores SSR
Liana Jank	031.120.498-88	Doutora	Embrapa Gado de Corte	Responsável pelo estabelecimento e manutenção da coleção e produção de híbridos da espécie <i>Panicum maximum</i> na Embrapa Gado de Corte.
Luciano Paulino da Silva	804.882.851-00	Doutor	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia	Extrações de DNA e análises com marcadores SSR
Lucimara Chiari	174.020.388-74	Doutora	Embrapa Gado de Corte	Biblioteca de sequências diferencialmente expressas de <i>Panicum maximum</i> Jacq. em resposta à infecção pelo fungo <i>Bipolaris maydis</i> (Nisik.) Shoemaker.
Marcelo Ayres Carvalho	329.980.581-91	Doutor	Embrapa Cerrados	Início da construção do mapa genético e mapeamento de QTLs para resistência a antracnose em <i>S. guianensis</i> .
Marilia Santos Silva	647.662.171-87	Doutora	Embrapa Cerrados	Descrver a etiologia de potenciais doenças virais ocorrentes em forrageiras tropicais.
Murillo Lobo Junior	622.558.516-87	Doutor	Embrapa Arroz e Feijão	Epidemiologia e manejo de doenças radiculares em forrageiras.
Newton Valério Verbisck	860.291.696-53	Doutor	Embrapa Gado de Corte	Participação na discussão dos resultados sobre proteínas/genes relacionadas a resistência. Pesquisador da Embrapa Gado de Corte; Área: Proteômica Animal.
Renato Oliveira Resende	323.883.906-30	Doutor	UnB	Descrver a etiologia de potenciais doenças virais ocorrentes em forrageiras tropicais.
Rosangela Maria Simeão	631.410.786-53	Doutora	Embrapa Gado de Corte	Responsável pelo BAG de <i>Stylosanthes guianensis</i> na Embrapa Gado de Corte - obtenção do material vegetal para utilização no projeto
Said Sadiq Adi	786.306.571-20	Doutor	UFMS	Análises das sequências obtidas do seqüenciamento dos cDNAs diferencialmente expressos
Apoio Técnico	CPF	Categoria/Instituição		
Aline Rodrigues Rabello	009.300.231-96	Embrapa Cerrados		Descrver a etiologia de potenciais doenças virais ocorrentes em forrageiras tropicais.
Francisco Antônio Quetez	773.628.703-10	Embrapa Gado de Corte		Coleta das amostras de solo, raízes e plantas com sintomas de presença de fungos fitopatogênicos e de nematóides.
Gisele Olivas Leguizamón	422.024.341-00	Embrapa Gado de Corte		Extrações de DNA
Heidi Christina Bessler Cunha	699.593.311-72	Embrapa Cerrados		Descrver a etiologia de potenciais doenças virais ocorrentes em forrageiras tropicais.
Marco Antônio Marques	445.529.631-04	Embrapa Gado de Corte		Implantação criação massal de <i>Mahanarva</i> na Embrapa Gado de Corte
Margareth Vieira Batista	365.182.471-34	Embrapa Gado de Corte		Inoculação de fungos patogênicos em genótipos/cultivares de <i>Brachiaria</i> , <i>Panicum</i> e <i>Stylosanthes</i> .
Marlene da Conceição Monteiro Oliveira	164.146.161.68	Agraer/ Embrapa Gado de Corte		Avaliação e ajustes no método de criação massal de <i>Mahanarva</i> .
Renato Henrique Marçal de Oliveira	028.353.059-63	Embrapa Gado de Corte		Extrações de DNA
Robson Santos Alves	578247621-49	Embrapa Cerrados		Prospectar genótipos vegetais de forrageira com resistência natural a vírus transmitidos mecanicamente.
Alunos/bolsistas	CPF	Categoria/Instituição		Atividades desenvolvidas no projeto
Carolina Sant'Ana Robles	004.627.811-78	Mestranda em / UFMS		Análises das sequências obtidas do seqüenciamento dos cDNAs diferencialmente expressos
Caroline de Arruda Queiróz	011.703.081-39	Mestranda em agronomia/UEMS		Fontes de resistência de plantas forrageiras a <i>Pratylenchus</i> spp e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no sistema de integração lavoura-pecuária.
Cassia de Carvalho	999.961.621.68	Mestranda em agronomia/UEMS		Hospedabilidade de plantas forrageiras à <i>Pratylenchus brachyurus</i> e a eficiência do controle biológico com uso de <i>Trichoderma harzianum</i> .
Guilherme Mallmann	939.082.880-53	Doutor/ Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional/CNPq/Micologia/Embrapa Gado de Corte		Avaliação de genótipos de forrageiras para resistência a doenças
Guilherme Sobral de Macedo	023.176.031-00	Graduando/ Zootecnia/UFMS		Coleta das amostras de solo, raízes e plantas com sintomas de presença de fungos fitopatogênicos e de nematóides.
Katyuce da Silva Chermouth	959.973.931-00	Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial Nível II/CNPq/Embrapa Gado de Corte		Seleção de genótipos/cultivares de <i>Brachiaria</i> , <i>Panicum</i> e <i>Stylosanthes</i> para resistência de fungos e nematóides
Marcelo José da Silva	986.796.601-59	Graduando/ Ciências		Inoculação de fungos patogênicos em

		Biológicas/UNIDERP-Anhanguera	genótipos/cultivares de <i>Brachiaria</i> , <i>Panicum</i> e <i>Stylosanthes</i> .
A definir	-	Mestrando em Agricultura Tropical/UFMT	Diagnose e controle de fungos e nematóides associados a forrageiras no Mato Grosso
Priscila Laranjeira Rôdas	010.379.451-40	Graduanda/ Ciências Biológicas/UNIDERP-Anhanguera	Seleção de acessos de <i>Brachiaria</i> e <i>Panicum maximum</i> para resistência às cigarrinhas-das-pastagens

m) indicação de colaborações ou parcerias já estabelecidas com outros centros de pesquisa na área, incluindo contrapartida das instituições participantes;

Para o desenvolvimento do Projeto, várias instituições estarão envolvidas, conforme pode ser observado no quadro da equipe, descrita no item “i” desta proposta. Vale ressaltar a parceria entre a Embrapa e a Unipasto (Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais, que congrega 27 dos maiores produtores de sementes de forrageiras tropicais do Brasil, os quais são os principais usuários das tecnologias geradas e que também atuam como transferidores de tecnologia).

De modo geral, a contrapartida das instituições envolvidas para a execução deste projeto refere-se à infra-estrutura que as mesmas oferecem em termos de Laboratórios especializados, dotados da maioria dos equipamentos necessários para a execução das ações de pesquisa previstas. Assim, está sendo requisitado ao CNPq apenas parte dos equipamentos que serão necessários, como também recursos para custeio, com disponibilidade restrita. Para a instalação dos experimentos de campo, área, máquinas e mão-de-obra serão disponibilizadas pelas instituições envolvidas. Além dos pesquisadores envolvidos no projeto, pessoal de apoio qualificado estará disponível para auxiliar na instalação e avaliação dos experimentos. As instituições envolvidas, sobretudo a Embrapa Gado de Corte, também oferecerão os serviços de correios, internet e de telefonia, assim como acervo bibliográfico para consultas.

n) estimativa dos recursos financeiros de outras fontes que serão aportados por eventuais parceiros;

Não há.

o) 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;

Existe forte compromisso de todas as instituições envolvidas nessa Proposta, bem como dos produtores e todos os demais elos do setor produtivo de sementes de forrageiras tropicais, pelo desenvolvimento das atividades previstas no Projeto.

p) outras considerações; e

Não há.

q) referências bibliográficas

ALMEIDA, A.A.S.; MONTEIRO, F.A.; JANK, L. Avaliação de *Panicum maximum* Jacq. para tolerância ao alumínio em solução nutritiva. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v.24, p.339-344, 2000.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Performance of *Metarhizium anisopliae* formulations with oil adjuvants on *Tenebrio molitor*. In: McMullan, P.M. (ed), Int. Symp. Adjuvants for Agrochemicals, 5, Memphis, TN. Vol.1.p:170-175. 1998.

ALVES, S.B.; REGITANO, R.L.O.; CAMARGO, J.L.G. Avaliação da influência de alguns herbicidas utilizados em cana-de-açúcar e pastagens sobre o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, 1883. **Ecossistema**, 5:21-4, 1980.

ANDRADE, C.M.S. de; VALENTIM, J.F. Soluções tecnológicas para a síndrome da morte do capim-marandu. In: BARBOSA, R.A. (ed.). Morte de pastos de braquiárias. 2006. p. 175-197.

ANDRADE, C.M.S.; VALENTIM, J.F. Recuperação da capacidade produtiva de uma pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com adubação nitrogenada ou fosfatada. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ/ Embrapa Gado de Corte, 2004. (CD-ROM).

ANDRADE, R. P. de. Pasture seed production technology in Brasil. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19, 2001. São Pedro. **Proceedings...** FEALQ:Piracicababa, 2001. p. 129-132.

ANUALPEC. Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Angra FNP Pesquisas, 2009. 360p.

BARBOSA, F. R. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de cigarrinhas-das-pastagens. In: Fernandes, O. A.; Corrêa, A. do C. B. & Bortoli, S. A. de (eds.). Manejo integrado de pragas e nematóides, vol. 1. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina, Veterinária e Zootecnia (FUNEP), Jaboticabal, SP, Brasil. p. 171-182. 1990.

BARBOSA, R.A. (Ed.). **Morte de pastos de braquiárias**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006. 206p.

BARNETT, L.; HUNTER, B.B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**, 3^a ed. Minnesota, Burgess Publishing Company, 1972. 241 p.

BIANCO, R.; VILLACORTA, A. Desenvolvimento e preferência de *Deois flavopicta* por diferentes forrageiras. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3, e CONGRESSO DE ENTOMOLOGIA, 5, Ilhéus, 1978. **Resumo**. Ilhéus, CEPEC, (s.p.), 1978.

BOCK, K.R., GUTHRIE, E.J.; WOODS, R.D. Purification of maize streak virus and its relationship to viruses associated with streak diseases of sugarcane and *Panicum maximum*. **Annual Applied Biology**. V.77, p.289-296, 1974.

BORGES, V.E. Estudo de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 para controle de cigarrinhas-das-pastagens. Piracicaba, ESALQ, 1985, 98p. Dissertação de Mestrado.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p.248-254, may 1976.

BÜCHEN-OSMOND, C. *Panicum* mosaic virus. In: **ICTVdB - The Universal Virus Database**, version 3. BÜCHEN-OSMOND, C. (ed.). ICTVdB Management, Columbia University, New York, USA. 2004.

BUENO, V.H.P. Aspectos biológicos e ritmo diário das atividades de *Porasilus barbiellinii* predador das cigarrinhas-das-pastagens. **Pesq. Agropec. Bras.**, 22(9-10):903-915, 1987.

CARDONA, C.; MILES, J.W.; SOTELO, G. An improved methodology for massive screening of *Brachiaria* spp. genotypes for resistance to *Aeneolamia varia* (Homoptera: Cercopidae). **J. Econ. Entomol.**, 92(2): 490-496, 1999.

CARDONA, C.; FORY, P.; SOTELO, G.; PABON, A.; DIAZ, G.; MILES, J.W. Antibiosis and Tolerance to five species of spittlebug (Homoptera: Cercopidae) in *Brachiaria* spp.: implications for breeding for resistance. **J. Econ. Entomol.**, 97(2): 635-645, 2004.

CARVALHO, G.S. Cercopídeos neotropicais: Redescrção de *Notozulia* Fennah, stat. n. (Auchenorrhyncha: Cercopidae). **An. Soc. Entomol. Brasil**, 24(2):385-88, 1995.

CHAKRABORTY, S.; CAMERON, D.F.; IRWIN, J.A.G.; EDIE, L.A. Quantitatively expressed resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* in *Stylosanthes scabra*. *Plant Pathology*, v. 37, p. 529-537, 1988.

CHAKRABORTY, S.; BILLARD L. Quantitative relationships between *Colletotrichum gloeosporioides* infection of *Stylosanthes scabra* and weather under field conditions. *Plant Pathology*, v. 44, p. 63-72, 1995.

CHAKRABORTY, S.; PERROTT, R.; CHARCHAR, M.J. FERNANDES, C.D.; KELEMU, S. Biodiversity, epidemiology and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides*- Genetic and pathogenic diversity in isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from eight species of *Stylosanthes*. *Tropical Grasslands*, v. 31, p. 393-401, 1997.

CHAKRABORTY, S.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. J. D'A; THOMAS, M. Pathogenic variation in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in a center of diversity in Brazil. *Phytopathology*, Palo Alto, v. 92, n. 3, p.553-562, 2002.

CHARCHAR, J.M.; HUANG, C.S. Círculo de hospedeiras de *Pratylenchus brachyurus* II - hortaliças. *Fitopatologia*

Brasileira 6:67-72. 1981.

CHEVREUX, B.; PFISTERER, T.; DRESCHER, B.; DRIESEL, A.J.; MÜLLER, W.E.G.; WETTER, T.; SUHAI, S. Using the miraEST Assembler for Reliable and Automated mRNA Transcript Assembly and SNP Detection in Sequenced ESTs. **Genome Research**, v. 14, p. 1147-1159, June 2004.

COMBES, D., PÉRNES, J. Variation des nombres chromosomiques du *Panicum maximum* en relation avec le mode de reproduction. **Comptes Rendues Academie Science**, Paris, Sér. D., v.270 p.782-785. 1970.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3674-3676, Sep. 2005.

CONSOLI, L.; DAMERVAL, C. Quantification of individual zein isoforms resolved by two-dimensional electrophoresis: genetic variability in 45 maize inbred lines. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 22, p. 2983-2989, 2001.

COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: Nematology and Entomology Research Station, 1972. 77p.

COSENZA, G.W. Resistência de capins à cigarrinha-das-pastagens, *Deois flavopicta*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 7, Fortaleza, 1981. **Resumos**. Fortaleza, Sociedade Entomológica do Brasil, 1981, p.32.

COSTA, M.D. de M.; MAGALHÃES, C.D. Um novo meio de cultura para o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, parasito da cigarrinha-das-pastagens. **B. Inst. Biol. Bahia**, Salvador, 13(1):57-60, 1974.

CRESTE S, TULMANN A, FIGUEIRA A. 2001. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphism in denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299-306.

DAVIS, R.D.; IRWIN, J.A.G.; CAMERON, D.F. Variation in virulence and pathogenic specialization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from *Stylosanthes scabra* cv. Fitzroy and Seca. *Australian Journal Agricultural Research*, v. 35, p. 653-62, 1984.

DIAS FILHO, M. B.; ANDRADE, C. M. S. Pastagens no ecossistema do Trópico Úmido. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia : SBZ, 2005. p. 95-104.

DIAS-ARIEIRA, C.R.; FERRAZ, S.; RIBEIRO, R.C.F. Reação de gramíneas forrageiras a *Pratylenchus brachyurus*. **Nematologia Brasileira**, v. 33 (1): 90-93, 2009.

DOMINGUES, J.M. SANTOS, E.M. da. Estudo da biologia da cigarrinha das pastagens *Zulia entreriana* (Berg, 1879), e sua curva populacional no norte do Estado do Espírito Santo. Vitória, EMCAPA, 1975. 43p. (EMCAPA. Boletim Técnico, 2).

EL-KADI, M.K. Controle químico das cigarrinhas-das-pastagens. Triagem de inseticidas no campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 6, Campinas, 1980. **Resumos**. Campinas, 1980. p.108-9.

FERNANDES, C.D. **Resistência de progênies de *Stylosanthes capitata* e *S. macrocephala* à antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides***. 90p. 2003. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu.

FERRUFINO, A.; LAPOINTE, S.L. Host plant resistance in *Brachiaria* grasses to the spittlebug *Zulia colombiana*. **Entom. Exp. Appl.**, 51:155-162, 1989.

FEWKES, D.W.; DEMIDECKI-DEMIDOWICZ, M.R. Rearing technique for sugar cane froghopper nymphs (Homoptera: Cercopidae). **Ann. Entomol. Soc. Amer.**, 64(1): 1471-1472, 1971.

FONTES, E.G.; PIRES, C.S.S.; SUJII, E.R. Mixed risk-spreading strategies and the population dynamics of a Brazilian pasture pest, *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae). **J. Econ. Entomol.** 88(5):1256-1262, 1995.

GARCIA, J.F. Técnica de criação e tabela de vida de Mahanarva fimbriolata (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae). Piracicaba: USP/ESALQ, 2002. 59p. (Dissertação - Mestrado).

GARRETT, K.A.; DENDY,S.P.; POWER, A.G.; BLAISDELL, G.K.; ALEXANDER,H.M.; MCCARRON, J.K. Barley yellow dwarf disease in natural populations of dominant tallgrass prairie species in Kansas. **Plant Disease**, v.88, p.574, 2004.

- GODWIN, I.D.; CAMERON, D.F.; GORDON, G.H. Variation among somaclonal progenies from three species of *Stylosanthes*. *Australian Journal of Agriculture Research*, v. 41, p. 645-656, 1990.
- GONTIJO NETO, M.M.; JANK, L.; LAURA, V.A. et al. Seleção de genótipos de *Panicum maximum* para áreas sujeitas a alagamentos temporários. In: GRASSLAND ECOPHYSIOLOGY AND GRAZING ECOLOGY, 2., 2004, Curitiba. **Resumos...** Curitiba: UFPR:UFRGS:IAPAR:EMBRAPA:ESALQ, 2004. CD-ROM.
- HACKER, J.B.; JANK, L. Breeding tropical and subtropical grasses. In: CHERNEY, J.H.; CHERNEY, D.J.R., ed. **Grass for dairy cattle**. Cambridge: CABI Publishing, 1998. p.49-72.
- HOISINGTON D, KHAIRALLAH M, GONZÁLEZ-DE-LEÓN D. 1994. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Mexico: CIMMYT.
- HOLMANN, F.; PECK, D.C. Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: A first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. **Neotropical Entomology**, 31(2): 275-284. 2002.
- HURKMAN, W.; TANAKA, C. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology**, Washington, v. 81, n. 3, p. 802-806, July 1986.
- INOMOTO MM, MOTTA LCC, MACHADO ACZ, SAZAKI CSS. Reação de dez coberturas vegetais a *Pratylenchus brachyurus*. *Nematologia Brasileira*. 30:151-157.2006.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE - Pesquisa Pecuária Municipal Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em 04/2006.
- IRWIN, J.A.G.; CAMERON, D.F.. Two diseases in *Stylosanthes* spp. caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Australia and pathogenic specialization within one of the causal organisms. *Australian Journal of Agriculture Research*, v. 29, p. 305-317, 1978.
- IRWIN, J.A.G.; TREVORROW, P.R.; CAMERON, D.F. Histopathology of compatible interactions involving biotypes of *Colletotrichum gloeosporioides* that causes anthracnose of *Stylosanthes* spp. *Australian Journal of Botany*, Melbourne, v.32, n.6, p.631-640, 1984.
- IRWIN, J.A.G.; CAMERON, D.F.; DAVIS, R. D.; LENNÉ, J.M. Anthracnose problems with *Stylosanthes*. *Tropical Grasslands Society- Occasional Publication*, Brisbane, n. 3, p. 38-46., 1986.
- JANK, L.; COSTA, J.C.G.; SAVIDAN, Y.H.; VALLE, C.B.do. New *Panicum maximum* cultivars for diverse ecosystems in Brazil. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS. 17., 1993, Palmerston North. **Proceedings...** Palmerston North: New Zeland Grassland Association, 1993. p. 509-511.
- JANK, L.; SAVIDAN, Y.H.; SOUZA, M.T.de; COSTA, J.C.G. Avaliação do germoplasma de *Panicum maximum* introduzido da África: 1. Produção forrageira. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 23, n. 3, p. 433-440, 1994.
- JANK, L. Melhoramento e seleção de variedades de *Panicum maximum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 12., 1995, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1995. p.21-58.
- JANK, L.; CALIXTO, S.; COSTA, J.C.G.; SAVIDAN, Y.H.; CURVO, J.B.E. Catálogo de caracterização e avaliação de germoplasma de *Panicum maximum*: descrição morfológica e comportamento agrônomo. Campo Grande, EMBRAPA-CNPq, 1997. 53p. (EMBRAPA-CNPq, Documentos, 68).
- JANK, L.; RESENDE, R.M.S.; CALIXTO, S.; GONTIJO NETO, M.M.; LAURA, V.A.; MACEDO, M.C.M.; VALLE, C.B. do. Preliminary performance of *Panicum maximum* accessions and hybrids in Brazil. In: XX INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 20., 2005, Dublin. **Proceedings**. Wageningen Academic Publishers: The Netherlands, 2005. p. 109.
- JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do et al. Melhoramento genético de *Panicum maximum*. In: RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do; JANK, L. (Ed.) **Melhoramento de forrageiras tropicais**. 1.ed. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2008. p.55-87.
- JENKINS, W. R. A **rapid centrifugal – flotation technique for separating nematodes from soil**. *Plant Disease Report*, v. 48, 1964. p. 692.

- KAO CH, ZENG ZB, TEASDALE R. 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152: 1203-1216.
- KITAJIMA E. W.; FERNANDES, A. T. F.; REZENDE J. A. M.; FERNANDES, C. D.. Mosaico em *Stylosanthes scabra* associado a um Potyvirus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 336, 1997.
- KOSAMBI DD. 1944. The estimation of map distances from recombinant values. *Annals of Eugenics, Cambridge, Inglaterra* 12:172-175.
- LAPOINTE, S.L.; SOTELO, G. & ARANGO, G. Improved technique for rearing spittlebugs (Homoptera: Cercopidae). **J. Econ. Entomol.** 82(6):1764-1766, 1989a.
- LAPOINTE, S.L.; SOTELO, G. & ARANGO, G. Cria masiva de especies de cercópidos en invernadero. **Pasturas tropicales.** 82(3):25-28, 1989b.
- LAPOINTE, S.L.; SERRANO, M. S. ; ARANGO, G.L.; SOTELO, G. & CORDOBA, F. Antibiosis to spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in accessions of *Brachiaria*. **J. Econ. Entomol.**, 85(4):1485-1490, 1992.
- LAURA, V.A.; JANK, L.; GONTIJO NETO, M.M. Área foliar específica, biomassa e taxa de crescimento relativo de folhas de cultivares comerciais de *Panicum maximum* sob sombreamento artificial. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006. CD Rom.
- LENNÉ, J.M.; THOMAS, D.; ANDRADE, R.P. de. & VARGAS, A. Anthracnose of *Stylosanthes capitata*: Implications for future disease evaluations of indigenous tropical pasture legumes. *Phytopathology, St. Paul*, v. 74, p.1070-3, 1984.
- MACEDO, M. A. M. Pastagens no ecossistema Cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia: Universidade de Goiás, 2005. p.56-84.
- MARCHI, C. E. ; FERNANDES, C. D. ; SANTOS, J. M. dos ; JERBA, V. F. ; FABRIS, L. R. . Mortalidade de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu: causa patológica?. In: Barbosa, R. A.. (Org.). Morte de pastos de braquiárias.. 1 ed. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006, p. 115-134.
- MARQUES, I.M.R. Distribuição de *Salpingogaster nigra* (Diptera, Syrphidae) predador específico de ninfas de cigarrinhas da raiz (Homoptera, Cercopidae) em algumas regiões do Brasil. **An. Soc. Entomol. Bras.**, 17(Supl.):67-74. 1988.
- MARTIN, R.M.; COX, J.R., ALSTON, D.G. & IBARRA, F. Spittlebug (Homoptera: Cercopidae) life cycle on Buffelgrass in Northwestern Mexico. **Annals Entomological Society America.** 88(4): 471-478. 1995.
- MATTA, E.A.F. da. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* no controle à cigarrinha das pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE A *Brachiaria* E OUTRAS FORRAGEIRAS. Salvador, 1977, **Anais.** Salvador, Federação da Agricultura do Estado da Bahia, 1977, p.37-8.
- McWILLIAMS, J.M.; COOK, J.M. Technique for rearing the twolined spittlebug. **J. Econ. Entomol.** 68(4): 421-422. 1975.
- MENEZES, M. As cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera: Cercopidae) na região sul da Bahia, Brasil: identificação, distribuição geográfica e plantas hospedeiras. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Itabuna, 1982, 48p. (CEPLAC/CEPC. Boletim Técnico, 104).
- MIH, A.M.; HANSON, J. Alfalfa mosaic virus: occurrence and variation among isolates from forage legumes in Ethiopia. **Tropical Grasslands**, v.32, p.118-123, 1998.
- MILANEZ, J.M. Dinâmica populacional de *Zulia (Notozulia) entreriana* (Berg, 1879) e *Deois (Acanthodeois) flavopicta* (Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae) em diferentes gramíneas. Piracicaba, ESALQ, 1980. 79p. Dissertação de Mestrado.
- MILES, J.W.; LAPOINTE, S.S.; SCANDÓN, M.L & SOTELO, G. Inheritance of resistance to spittlebug (Homoptera: Cercopidae) in interespecific *Brachiaria* spp hybrids. **J. Econ. Entomol.**, 88(5):1477-1481, 1995.
- MISHRA, A.; GOHEL, V.R.; VALAND, G.B.; PATEL, J.G.; SHUKLA, D.D. Peanut stripe virus disease of groundnut-a review. **International Journal of Pest Management**, v.39, p.210 215, 1993.

- MORALES, F.J.; CASTANO, M.; VELASCO, A.C.; ARROYAVE, J.; ZETTLER, F.W. Natural infection of tropical forage legume species of *Arachis* and *Stylosanthes* by potyviruses related to peanut mottle virus. **Plant Disease**, v.75, p.1090-1093, 1991.
- MORALES, F.J.; OSPINA, M.D.; CASTANO, M.; CALVERT, L.A. Sequence analysis of the genomic RNA 3'-terminal region of a potyvirus from *Brachiaria* spp. related to guineagrass mosaic virus. **Journal of Phytopathology**, v.144, n.9-10, p.485-489, 1996.
- NIBLETT, C.L.; PAULSEN, A.Q. Purification and further characterization of *Panicum* mosaic virus. **Phytopathology**, v.65, p.1157-1160, 1975.
- NILAKHE, S.S. Avaliação da resistência de gramíneas às cigarrinhas das pastagens. **Pesq. Agropec. Bras.**, 22(8):767-83, 1987.
- NIU, B.; FU, L.; SUN, S.; LI, W. Artificial and natural duplicates in pyrosequencing reads of metagenomic data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, 2010.
- PACHECO, J.M.; SILVA, C.R.S.; RUVOLO, M.C.C. Técnica de criação de ninfas das cigarrinhas-das-pastagens *Deois (Acanthodeois) flavopicta* (Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. 26(1): 109-112, 1982.
- PECK, D. Natural history of the spittlebug *Prosapia* nr. *bicincta* (Homoptera: Cercopidae) in association with dairy pastures of Costa Rica. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, 91(4): 435-444, 1998.
- PEREIRA, J.M.; REZENDE, C. de P.; RUIZ, M.A.M. Pastagem no ecossistema Mata Atlântica: atualidades e perspectivas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia: Universidade de Goiás, 2005. p.36-55.
- PIRES, C.S.S.; FONTES, E.M.G.; SUJJI, E.R.; FERNANDES, H.M.C. & GOMES, D.F. Ocorrência de *Anagrus* sp. (Hymenoptera, Mymaridae) parasitando ovos de *Deois flavopicta* Stal. (Homoptera, Cercopidae) em pastagens do Brasil central. **An. Soc. Entomol. Bras.**, 22(2):411-413. 1993.
- POTTINGER, R.P. The importance of pasture pests in animal production. **Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod.**, 36:12-22. 1976.
- RAMOS, I.M. Biologia da cigarrinha-das-pastagens *Zulia entreriana* (Berg.1879) (Homoptera: Cercopidae). Piracicaba, ESALQ, 72 p. Dissertação de Mestrado. 1976.
- SAKAKIBARA, A.M. Sobre algumas espécies brasileiras de *Deois* Fennah, 1948 (Homoptera: Cercopidae). **Rev. Bras. Entomol.**, 39(1):9-30, 1979.
- SANTOS, J.C.S. et.al. Associação de fungos fitopatogênicos em sementes de pastagens do gênero *Brachiaria*. **Fitopatologia Brasileira**. v.32, Suplemento, p.222. 2007.
- SANTOS, M. O.; KARIA, C. T.; RESENDE, R. M. S.; CHIARI, L.; JUNGSMANN, L; ZUCCHI, M. I.; SOUZA, A. P. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in tropical forage legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Conservation Genetics Resources. Online first: DOI: 10.1007/s12686-009-9010-2.
- SARAVANAN, R.S.; ROSE, J.K.C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 9, p. 2522-2532, sept. 2004.
- SAVIDAN, Y.H. **Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum***. Paris : ORSTOM, 1982. p.159. (ORSTOM. Travaux et documents, 153).
- SILL, W.H.; PICKETT, R.C. A new virus disease of switchgrass, *Panicum virgatum* L. **Plant Disease Reporter**, v.41, p.241-249, 1957.
- SILVA, A.S.; LAURA, V.A.; JANK, L.; GONTIJO NETO, M.M.; FERNANDES, V. Biomassa seca de raiz e da parte aérea de genótipos de *Panicum maximum* alagados e não alagados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006. CD Rom.
- SILVEIRA NETO, S. Controle de insetos e outras pragas das pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO DE PASTAGEM, 3, Piracicaba, **Anais**. Piracicaba, Fundação Cargill, 1976. p.137- 90.

- SMYTH, G.K., CHAKRABORTY, S., CLARK, R.G., PETTITT, A.N. A statistic model for anthracnose development in *Stylosanthes scabra*. *Phytopathology*, St. Paul, v.82, n.11, p.1267-1272, 1992.
- SOTELO, G.; LAPOINTE, S.L.; ARANGO, G.L. Nueva técnica de cria del “salivazo de los pastos” en invernadero (Homoptera: Cercopidae). **Revista Colombiana de Entomología**. 14(1): 3-6, 1988.
- SOTELO, G.; CARDONA, C.; MILES, J. Metodología mejorada para evaluación de resistencia de *Brachiaria* spp. al salivazo de los pastos (Homoptera: Cercopidae) en invernadero. **Revista Colombiana de Entomología**. 24(1-2): 17-22, 1998.
- SOTELO, G.; CARDONA, C.; MILES, J. Desarrollo de híbridos de *Brachiaria* resistentes a cuatro especies de salivazo (Homoptera: Cercopidae). **Revista Colombiana de Entomología**. 29(2): 157-163, 2003.
- STORÓPOLI NETO, A.; PAVAN, C. Novo método de criação de cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera: Cercopidae). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 19, n. 10, p. 1185-1196, 1984.
- SUJII, E.D. Modelagem e simulação da dinâmica populacional da cigarrinha-das-pastagens, *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae). Campinas, UNICAMP, 213 p. Tese de Doutorado. 1998.
- SUTTON, B. C. The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew, **Crommonwealth Mycological Institute**, 1980. 696 p.
- TANAKA, M. A. S. Técnicas auxiliares em laboratório de patologia de sementes. In: SDAVE, J. & Wetezel, M. M. V. S. (Eds.) **Patologia de Sementes**. 1987. 9. 313-29.
- THOMAS, D. & LAPOINTE, S. Testing new accessions of guinea grass (*Panicum maximum*) for acid soils and resistance to spittlebug (*Aeneolamia reducta*). **Tropical Grasslands**, 23(4):232-39, 1989.
- THOUVENEL, J.C., GIVORD, L. & PFEIFFER, P. Guinea grass mosaic virus, a new member of the potato virus Y group. **Phytopathology** 66: 954-957, 1976.
- THOUVENEL, J.C.; MORALES, F.J. Guinea-grass mosaic. In LAPIERRE, H.; SIGNORET, P.A. (eds.), **Viruses and virus diseases of Poaceae (Gramineae)**, INRA Editions, Versailles, pp. 766-767, 2004.
- VALÉRIO, J. R.; KOLLER, W. W. Avaliação de gramíneas forrageiras para resistência às cigarrinhas-das-pastagens. Campo Grande, EMBRAPA-CNPq, 1982. 3p. (EMBRAPA-CNPq. Pesquisa em Andamento, 19).
- VALÉRIO, J. R. Caracterização e avaliação dos danos causados pela cigarrinha-das-pastagens *Zulia entreriana* (Berg, 1879) em *Brachiaria decumbens* Stapf. cv. Basilisk. Piracicaba, ESALQ, 1985, 152p.
- VALÉRIO, J. R.; NAKANO, O. Dano causado por adulto da cigarrinha *Zulia entreriana* (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae) na produção de raízes de *Brachiaria decumbens* Stapf. **An. Soc. Entomol. Brasil**, 16(1):205-12, 1987a.
- VALÉRIO, J. R.; NAKANO, O. Taxa de excreção e atividade alimentar do adulto da cigarrinha-das-pastagens *Zulia entreriana*, (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae). **An. Soc. Entomol. Brasil**, 16(2):333-40, 1987b.
- VALÉRIO, J. R.; NAKANO, O. Danos causados pelo adulto da cigarrinha das pastagens *Zulia entreriana* (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae) em plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. mantidas em diferentes níveis de umidade. **An. Soc. Entomol. Brasil**, 16(2):341-50, 1987c.
- VALÉRIO, J. R.; VALLE, C. B. Avaliação de introduções do gênero *Brachiaria* visando resistência à cigarrinha-das-pastagens *Zulia entreriana* (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae). In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 27, ANAIS, Sociedade Brasileira de Zootecnia, Campinas, p. 281, 1990.
- VALÉRIO, J. R.; NAKANO, O. Sintomatologia dos danos causados pelo adulto da cigarrinha *Zulia entreriana* (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae) em *Brachiaria decumbens* STAPF. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, ano 21, n. 1, p. 95-100, 1992.
- VALÉRIO, J. R. Avaliação de gramíneas forrageiras visando resistência à cigarrinha *Zulia entreriana*. In: Reunião da Rede Internacional de Avaliação de Pastos Tropicais, ANAIS, Centro Internacional de Agricultura Tropical, p:493-496, 1992.
- VALÉRIO, J. R. Avaliação de introduções do gênero *Brachiaria* quanto à resistência à cigarrinha *Zulia entreriana* (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae). In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 14, RESUMOS, Sociedade Entomológica do Brasil, p. 397, 1993a.

- VALÉRIO, J. R. Obtenção de ovos de cigarrinhas (Homoptera: Cercopidae) em ágar-água. **An. Soc. Entomol. Brasil**, 22(3):583-90, 1993b.
- VALÉRIO, J. R. About the evaluation of forage grasses aiming resistance to the spittlebugs (Homoptera: Cercopidae). In: International Plant Protection Congress, 13, ABSTRACTS, The Hague, The Netherlands, n.p., 1995.
- VALÉRIO, J. R.; LAPOINTE, S. L.; KELEMU, S.; FERNANDES, C. D. ; MORALES, F. Pests and diseases of *Brachiaria*. In: THE BIOLOGY, AGRONOMY AND IMPROVEMENT OF *Brachiaria*. Eds. Miles, J.W.; Maass & Valle, C.B. CIAT, Cali, Colombia; pp:87-105, 1996.
- VALÉRIO, J.R., SOUZA, A.P. Screening tropical forage grasses for resistance to spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) In: 18 International Grassland Congress, 1997, WINNIPEG-SASKATOON, CANADA. Proceedings International Grassland Congress, 18. Abstract N.º 1219. 1997.
- VALÉRIO, J. R.; JELLER, H. ;PEIXER, J. Seleção de introduções do gênero *Brachiaria* resistentes à cigarrinha *Zulia entreciana* (Berg) (Homoptera: Cercopidae). **An. Soc. Entomol. Brasil**, 26(2):383-387, 1997.
- VALÉRIO, J. R.; VALLE, C. B.; SOUZA, A. P.; OLIVEIRA, M. C. M. Screening *Brachiaria* introductions for resistance to spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) In: 19 International Grassland Congress, 2001, São Pedro, SP. Proceedings International Grassland Congress, 19. Piracicaba: FEALQ, 2001. p.236– 237.
- VALÉRIO, J. R.; OLIVEIRA, M. C. M. Parasitismo de ovos de cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera: Cercopidae) pelo microhimenóptero *Anagrus urichi* Pickles (Hymenoptera: Mymaridae) constatado na região de Campo Grande, MS. **Neotropical Entomology** 34(1):137-138. 2005.
- VALÉRIO, J. R. Cigarrinhas-das-pastagens: Bioecologia, importância e alternativas de controle. In: Pereira, O.G. et al. (Eds.). SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 4., SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 2. 2008, Viçosa, MG. **Anais**. Viçosa: UFV; DZO, 2008. p. 353-372.
- VEIGA, A.F.S.L.; AQUINO, M. de L.N. & ARRUDA, G.P. Nota sobre o controle biológico da cigarrinha-das-pastagens (Homoptera: Cercopidae) com o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae*, no Estado de Pernambuco. **Pesq. Agropec. Nordeste.**, 4(2):71, 1972.
- VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. **Doenças em forrageiras**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 3p. (Embrapa Gado de Corte. Gado de Corte Divulga, 50).
- VICTOR, D.M.; JANK, L.; LEMPP, B. RESENDE, M.D.V. Efeito da redução da luminosidade no melhoramento de *Panicum maximum*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006. CD Rom.
- VINIJSANUN, T.; IRWIN, J.A.G.; CAMERON, D.F. Host range of three strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from tropical pasture legumes, and comparative histological studies of interactions between type B disease - producing strains and *Stylosanthes scabra* (non-host) and *S. guianensis* (host). *Australian Journal Botanic*, v. 35, p.665-77, 1987.
- WANG, L.; FENG, Z.; WANG, X.; WANG, X.; ZHANG, X. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. **Bioinformatics**, v. 26, p. 136-138, 2010.
- WEEDS, P.; CHAKRABORTY, S.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. J. D`A.; RAMESH, C. R.; KEXIAN, Y.; KELEMU, S. Genetic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* at centres of origin and utilization. *Phytopathology*, Palo Alto, v. 93, n. 1, p. 176-185, 2003.
- ZENG, Z. B; KAO, C. H.; BASTEN, C. J. 1999. Estimating the genetic architecture of quantitative traits. *General Research* 74: 279-289.

