

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

Anexo I – Modelo Estruturado de Projeto

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

Edital:	Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRO-CENTRO-OESTE Nº 031/2010
Coordenador/Proponente:	VALDEMIR ANTÔNIO LAURA
Título da Proposta:	Estratégias de fenotipagem e biotecnologia para a caracterização de forrageiras nativas e exóticas quanto à tolerância a estresses abióticos visando à adaptação às mudanças climáticas e a solos ácidos e de baixa fertilidade
Tipo de Proposta (Projeto de Pesquisa/Projeto de Rede):	Projeto de Pesquisa
Nome da Rede de Pesquisa:	Rede: Desenvolvimento de cultivares de forrageiras nativas e exóticas: mudanças climáticas e produção sustentável de proteína animal
Linha de Pesquisa e Tema:	Linha 1 – Ciência, Tecnologia e Inovação para Sustentabilidade da Região Centro-Oeste Tema 1 – Plantas de relevância regional e resistência a estresses bióticos (pragas, ervas daninhas, fungos, bactérias, vírus e nematódeos) e abióticos (alterações climáticas, limitações edáficas, entre outros).
Instituição Executora:	Embrapa Gado de Corte
Unidade da Federação:	Mato Grosso do Sul
Instituições Colaboradoras:	Universidade Católica de Brasília, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Cerrados, Universidade Estadual de Campinas
Valor Total Solicitado pelo Projeto de Pesquisa (R\$):	972.770,00
Prazo de Execução:	36 meses

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

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

Projeto de pesquisa intitulado “Estratégias de fenotipagem e biotecnologia para a caracterização de forrageiras nativas e exóticas quanto à tolerância a estresses abióticos visando à adaptação às mudanças climáticas e a solos ácidos e de baixa fertilidade”, a ser realizado no bioma cerrado de Mato Grosso do Sul, é o projeto 3, o qual fará parte da Rede “Desenvolvimento de cultivares forrageiras nativas e cultivadas: mudanças climáticas e produção sustentável de proteína animal”.

b) identificação da Linha de Pesquisa e Tema da proposta

A presente proposta está integrada a **Linha 1** – Ciência, Tecnologia e Inovação para Sustentabilidade da Região Centro-Oeste e inserida ao **Tema 1 – Plantas de relevância regional e resistência a estresses** bióticos (pragas, ervas daninhas, fungos, bactérias, vírus e nematódeos) e **abióticos (alterações climáticas, limitações edáficas**, entre outros).

No presente projeto serão fenotipadas gramíneas e/ou leguminosas forrageiras tropicais, nativas e exóticas, divergentes quanto à tolerância ao alumínio, à eficiência de uso aos nutrientes: Ca, Mg e P, ao alagamento e ao déficit hídrico, identificando os genótipos mais contrastantes para a obtenção de populações segregantes para dinamização dos programas de melhoramento, que já estão em condução na Embrapa Gado de Corte. Objetiva-se, também, a identificação e/ou validação de genes relacionados à tolerância: ao alumínio em *Brachiaria*, cujos estudos já foram iniciados e onde as populações segregantes encontram-se já disponíveis para o mapeamento de QTLs; e aos estresses hídricos (alagamento e seca) em *Brachiaria* e *Panicum maximum*. A prospecção de genes será realizada por meio de pirosequenciamento massivo 454 de cDNA para gerar milhares de Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs) que serão utilizadas para prospecção *in silico* de genes relacionados a esses estresses.

c) identificação dos Programas de Pós-Graduação envolvidos na proposta, bem como dos mecanismos de integração propostos no âmbito do projeto de Rede

Os Programas de Pós-Graduação envolvidos na presente proposta incluem o Mestrado em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, o Mestrado Profissional em Produção e Gestão Agroindustrial da Universidade Anhanguera-Uniderp (nos quais o coordenador dessa proposta é docente), Mestrado e Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília e o Mestrado em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco, no qual outros membros do projeto são docentes. Os experimentos serão conduzidos em Mato Grosso do Sul e em Brasília, sendo que os Programas de Pós-Graduação aqui envolvidos certamente terão acadêmicos de pós-graduação elaborando dissertação ou tese nos experimentos aqui propostos. Por outro lado, as reuniões periódicas entre os membros da REDE Desenvolvimento de cultivares forrageiras nativas e cultivadas: mudanças climáticas e produção sustentável de proteína animal serão realizadas, sob coordenação geral (REDE) da Dra Cacilda Borges do Valle, coordenação local (projeto de pesquisa) pelo Prof. Dr. Valdemir Antônio Laura, os estudantes, os professores dos programas de Pós-Graduação e dos demais pesquisadores envolvidos no projeto de pesquisa, permitirão uma troca contínua de informações, atualização das atividades e desdobramentos das pesquisas em rede.

d) qualificação do principal problema a ser abordado

A pecuária bovina brasileira conquistou novos mercados, aumentou as exportações de carne e atingiu a posição de maior exportador mundial em 2003. Um dos fatores determinantes para essa conquista foi a preferência dos consumidores por alimentos mais saudáveis, oriundos de sistemas de criação de bovinos baseados na utilização de pastagens, em detrimento aos

produtos originados de sistemas de criação intensiva baseados na manutenção dos animais confinados e alimentados com subprodutos de origem animal, que podem causar sérios problemas de sanidade animal, como ocorreu em diversos países da Europa.

As condições climáticas brasileiras, com abundância de radiação solar, proporcionam vantagens competitivas para a utilização da alimentação baseada em pasto, cujas características possibilitam a obtenção de produtos de qualidade e baixo custo. Entretanto, as mudanças climáticas globais e a expansão da agricultura sobre as áreas de pastagens imporão novos desafios às cadeias produtivas da carne e do leite no Brasil.

De acordo com o 4º Relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas das Nações Unidas (IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change), divulgado em 17/11/2007, as temperaturas médias na terra devem aumentar entre 1,8 e 4,0°C até o final desse século. Em decorrência, ocorrerão alterações nos padrões de distribuição e intensidade de ventos e nos regimes de chuvas, com a intensificação de eventos climáticos extremos, como secas, inundações, furacões e tempestades tropicais, assim como o aumento do nível dos oceanos, em virtude do derretimento das geleiras nos pólos, provocado pelas altas temperaturas. A intensificação dos estresses térmicos e hídricos será um problema inevitável para qualquer agronegócio nos trópicos. Sistemas de produção baseados em pastagens com maior plasticidade poderão, certamente, se adaptar às mudanças previstas na temperatura e disponibilidade de água, e contribuir para a mitigação das mudanças climáticas e da emissão de gases de efeito estufa (GEE), aumentando a eficiência na absorção e fixação de carbono, reduzindo as emissões de metano e óxido nitroso dos componentes dos sistemas.

Outro desafio previsto para as cadeias produtivas da carne e do leite bovinos no País será o avanço da agricultura sobre as áreas de pastagens. Segundo Bierhals e Ferraz (2008) em 1996 eram 177,7 milhões de hectares de pastagens no Brasil e, em 2006, houve um decréscimo para 172,3 milhões, o que corresponde a uma redução de 3%; já a área de lavoura aumentou de 41,8 milhões de hectares para 76,7 milhões, aumento de quase 84%. Por questões ambientais a abertura de novas áreas de pastagens é cada vez mais complexa e estas ficarão cada vez mais relegadas às áreas marginais com solos menos férteis e elevada acidez, ricos em alumínio e outros elementos tóxicos. Dessa maneira, torna-se imperativo a busca por maior conhecimento da variabilidade genética disponível e respostas relacionadas à tolerância a esses principais fatores de estresses abióticos relacionados às mudanças climáticas e a ocupação de áreas marginais por espécies forrageiras, de forma a garantir que no futuro a pecuária bovina brasileira possa contar com cultivares de forrageiras cada vez mais adaptadas ao novo cenário.

A pecuária bovina no Brasil tem grande parte da sua competitividade de custos atribuível à alimentação baseada em forrageiras tropicais, que pelas características genéticas, anatômicas e ambientais (clima e solo de cultivo) são mais fibrosas, com menor energia digestível e limitam a capacidade de ingestão/consumo da forragem pelos animais em pastejo, quando comparadas com aquelas de clima temperado. Tal fato, além de limitar o desempenho animal, resulta em dietas com maior potencial de emissão de metano por ocasião da digestão ruminal. Logo, ampliou-se consideravelmente o interesse por plantas com características nutricionais mais adequadas pelo impacto positivo que proporcionam tanto na produtividade animal como na redução das emissões de metano entérico. O grande desafio com este enfoque maior para a qualidade da forragem consiste em aliar estas características com aquelas ligadas à adaptação ao clima e ao solo.

Ademais, a identificação de genes relacionados a mecanismos de tolerância a estresses abióticos têm se mostrado potencial para serem usados em estudos de transformação de plantas e transferência dessas características para outras espécies cultivadas. É muito provável que as tecnologias para agricultura tropical, desenvolvidas pelo Brasil, tornem-se cada vez mais atrativas para os países de clima temperado, à medida que suas atividades agrícolas tiverem de se adaptar a climas mais quentes. Sendo assim, ao investir em capacidade tecnológica para a superação desses desafios, o País poderá conquistar posição de exportador de tecnologias críticas, além de insumos críticos na forma de variabilidade genética, para uma gama cada vez mais ampla de clientes, incluindo os países desenvolvidos.

No presente projeto tem-se como objetivo geral a fenotipagem de gramíneas e/ou leguminosas forrageiras nativas e exóticas divergentes quanto à tolerância ao alumínio, à

eficiência de uso aos nutrientes: Ca, Mg e P, ao alagamento e ao déficit hídrico, identificando os genótipos mais contrastantes para a obtenção de populações segregantes para dinamização dos programas de melhoramento. Ademais, visa à identificação e/ou validação de genes relacionados à tolerância ao alumínio em *Brachiaria*, cujos estudos já foram iniciados e onde as populações segregantes encontram-se disponíveis para o mapeamento de QTLs associados a essa característica, e à tolerância aos estresses hídricos (alagamento e seca) em *Brachiaria* e *Panicum maximum*, por meio de pirosequenciamento massivo 454 de cDNA para gerar milhares de Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs) que serão utilizadas para prospecção *in silico* de genes relacionados a esses estresses. Dessa forma, neste projeto serão integrados conhecimentos e tecnologias das áreas de fisiologia vegetal, fertilidade do solo, nutrição de plantas e biologia molecular, contribuindo para consolidar o uso dessas técnicas no dia-a-dia dos programas de melhoramento.

O projeto tem condições técnicas de gerar os resultados previstos no prazo determinado por contar com uma equipe capacitada da Embrapa e Universidades parceiras, infra-estrutura física adequada e fluxo de germoplasma já disponível. Ademais, o projeto prevê a realização de treinamento de pesquisadores no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Colômbia), instituição que trabalha no desenvolvimento de metodologias de fenotipagem e genotipagem em larga escala para esses estresses em gramíneas e leguminosas forrageiras tropicais. A parceria Embrapa-CIAT existe desde a década de 1980 e tem resultado em relevante progresso aos programas de melhoramento de forrageiras em ambas as Instituições.

Revisão de Literatura

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). Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2010), no ano de 2009 o Brasil teve um faturamento de US\$ 4,118 bilhões com as exportações de carne bovina.

As forrageiras constituem-se na principal fonte de alimento e em elemento crucial para a competitividade das cadeias produtivas da carne e do leite bovinos brasileiras no mercado mundial. O Brasil conta com cerca de 120 milhões de hectares de pastagens cultivadas (ANUALPEC, 2009). Contudo, estas têm sofrido grande pressão devida, principalmente, à expansão da agricultura. As pastagens estão cada vez mais relegadas às áreas marginais, com solos com graves limitações de fertilidade e elevada acidez. Esse fato associado às mudanças climáticas, que irá interferir no ciclo de chuvas e de severidade de eventos extremos, poderá impactar negativamente a produtividade e qualidade dessas pastagens. Este cenário impõe grandes desafios à manutenção da competitividade e sustentabilidade da pecuária nacional. Aspectos fisiológicos da resposta de gramíneas e/ou leguminosas forrageiras tropicais aos estresses por alumínio, alagamento e déficit hídrico, associados a esses novos desafios, têm sido estudados em projetos de pesquisa na Embrapa e no CIAT (EMBRAPA, 2007; CIAT, 2007). Entretanto, ainda há grande carência de informações que sirvam de base para aumento da efetividade dos programas de melhoramento genético dessas plantas.

O desenvolvimento deste projeto beneficiará diretamente os programas de melhoramento de forrageiras em curso na Embrapa. O envolvimento de técnicas biotecnológicas abordadas neste projeto deverá permitir avanços ainda mais rápidos na produção de novas variedades forrageiras no que tange a exploração de solos ácidos e de baixa fertilidade. Tal fato já é realidade para outras culturas, onde marcadores moleculares e/ou genes são utilizados na seleção assistida para características de resistência e ou tolerância a estresses bióticos e abióticos (KUMAR, 1999). As atividades biotecnológicas previstas aqui são uma continuidade de ações de projetos anteriores: 02.05.01.009.00 “Caracterização da Variabilidade Intra e Interespecífica da Tolerância ao Alumínio em Gramíneas para sua Utilização no Melhoramento Assistido” e 03.08.0.035.00.00 “Prospecção de Genes Associados à Tolerância ao Alumínio em Gramíneas Forrageiras do Gênero *Brachiaria*”, projetos estes desenvolvidos pela Embrapa.

Fitotoxicidade do Alumínio

A toxidez do alumínio (Al) para as plantas é um dos principais fatores responsáveis pela baixa produtividade em solos ácidos ($\text{pH} \leq 5,0$), os quais ocorrem em cerca de 70% do território brasileiro (COCHRANE, 1982) e 40% das terras agricultáveis no mundo (KOCHIAN, 1995). O efeito fitotóxico do Al advém de formas monoméricas parcialmente protonadas de Al^{3+} liberadas na solução desses solos a partir de compostos como $\text{Al}(\text{OH})_3$ e silicatos de Al (MARTIN, 1992). O ápice da raiz é o sítio primário da ação tóxica desse elemento; seu excesso inibe o crescimento normal de raízes, tornando-as engrossadas, com coloração marrom, menos ramificadas, quebradiças e ocasionalmente com manchas necróticas (FOY, 1992). Os sintomas de toxidez são estudados há anos e têm sido associados à deficiência de fósforo (P) e à reduzida absorção e translocação de cálcio (Ca) (FOY, 1974). O Al fixa o P em formas menos solúveis no solo ou nas raízes, e ainda pode interferir na absorção, transporte e utilização de vários nutrientes além do Ca, como magnésio (Mg) e potássio (K) e na água usada pelas plantas (FOY, 1976). A redução do crescimento da parte aérea ocorre num momento posterior como consequência dos danos que ocorrem na raiz (RYAN et al., 1993; JONES; KOCHIAN, 1995). Os sintomas nas folhas assemelham-se à deficiência de P, manifestada por características como folhas pequenas e escuras, crescimento lento, talos arroxeados, pontas de folha amarelas e/ou mortas (FOY, 1992).

Para melhor entender os princípios dos mecanismos de tolerância e sensibilidade ao Al, seus efeitos na inibição do crescimento da raiz e outros sintomas consequentes, é necessário elucidar onde o Al age e, principalmente, conhecer qual o efeito primário do Al responsável pelas modificações morfológicas e fisiológicas que ocorrem.

Duas categorias de mecanismo de tolerância ao Al têm sido propostas: mecanismos de exclusão e mecanismos de tolerância interna, cuja principal diferença reside no sítio de detoxificação do alumínio, apoplasto ou simplasto, respectivamente (KOCHIAN et al., 2004). Os mecanismos de exclusão previnem o Al de atravessar a membrana plasmática e penetrar no simplasto, sendo também considerados dentro desse tipo de mecanismo as modificações de pH da rizosfera e a exsudação pelas raízes de agentes quelantes. Por outro lado, os mecanismos de tolerância interna imobilizam, compartimentalizam ou detoxificam o alumínio que penetrou no simplasto.

Dentre as formas de detoxificação externa de Al uma das mais estudadas é a exsudação de ácidos orgânicos (MA, 2000; RYAN et al., 2001; KOCHIAN et al., 2004) ou de compostos fenólicos (KOCHIAN et al., 2004) pela raiz. No entanto, mecanismos de efluxo de fosfato (PELLET et al., 1996), secreção de proteínas que se ligam aos íons de Al (BASU et al., 1997), permeabilidade seletiva da membrana plasmática para reduzir a captura de Al para o citosol (ARCHAMBAULT et al., 1996), controle do pH da rizosfera mediado pelas raízes (DEGENHARDT et al., 1998) têm sido identificados como envolvidos na tolerância ao Al. A detoxificação interna de Al tem sido pouco estudada, mas inclui os mecanismos de captura dos íons tóxicos para o interior do vacúolo (ZHENG et al., 2005) ou processos metabólicos que quelam o Al no citosol (KOCHIAN, 1995). Estudos sobre a tolerância ao Al em *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk demonstraram que o nível de tolerância nessa cultivar é surpreendentemente alto mesmo quando comparado a outras plantas tolerantes como trigo, triticale e milho (WENZL et al., 2001, 2002).

Já está estabelecido que a tolerância ao Al seja geneticamente controlada e o padrão de herança depende da espécie estudada, podendo ser monogênica ou poligênica, mas, para a maioria das espécies, isso não está completamente esclarecido. Estudos de mapeamento molecular para genes de tolerância ao Al em gramíneas cultivadas da tribo Triticeae (trigo, cevada e centeio) têm sugerido que um ou poucos genes explicam a maior parte da variação fenotípica para tolerância ao Al (GARVIN; CARVER, 2003). Em trigo (*Triticum aestivum* L.) os principais genes estão localizados no braço curto do cromossomo 5 do genoma A e nos braços longos dos cromossomos 2 e 4 do genoma D (ANIOL; GUSTAFSON, 1984; ANIOL, 1990; LAGOS et al., 1991). Delhaize et al. (1993) associaram o loco *Alt1* com grande parte das diferenças de tolerância ao Al entre cultivares de trigo e, recentemente, o gene *Almt-1*, que codifica um transportador de malato ativado por alumínio em trigo, foi clonado por Sasaki et al. (2004). Gallego e Benito (1997) estudando dois cultivares de centeio (*Secale cereale*), um altamente tolerante e o

outro medianamente tolerante ao Al, propuseram a existência de três genes *Alt* controlando a tolerância ao Al, concordando com Aniol e Gustafson (1984) que haviam localizado três genes de tolerância ao Al nos cromossomos 3, 4 e 6 do genoma R dessa espécie. Em cevada (*Hordeum vulgare*), Stolen e Andersen (1978) encontraram um gene, designado *Pht*, que controla tolerância a solos com pH baixo, no loco K do cromossomo 4. O gene que controla a tolerância ao Al em cevada, denominado *Alp*, (REID, 1969) ainda não foi mapeado, mas parece estar fisicamente associado com o gene *Pht* no mesmo cromossomo (MINELLA; SORRELLS, 1997). Evidências apontam a existência de uma série alélica de locos ortólogos controlando a tolerância ao Al entre os membros dessa tribo (GARVIN; CARVER, 2003) baseadas na conservação da localização dos genes nos cromossomos homeólogos 4DL em trigo, gene *Alt_{BH}* (RIEDE; ANDERSON, 1996); 4H em cevada, gene *Alp* (TANG et al., 2000) e 4RL em centeio, *Alt3* (MIFTAHUDIN et al., 2002).

Recentemente, em sorgo (*Sorghum bicolor* L.) foi mapeado um gene de tolerância ao Al (*Alt_{SB}*) localizado na porção terminal do cromossomo 3. Os resultados apontam que, nessa espécie, essa característica também parece ser controlada por um ou pouco genes (MAGALHÃES et al., 2004; 2007). Por outro lado, a tolerância ao Al em milho (*Zea mays*) apresenta herança quantitativa (MAGNAVACA et al., 1987; LIMA et al., 1995). Sibov et al. (1999) identificaram dois QTLs associados com a tolerância ao Al nos cromossomos 6 e 10, enquanto que Ninamango-Cárdenas et al. (2003) mapearam cinco QTLs nos cromossomos 2, 6 e 8. E, em arroz (*Oryza sativa*) estudos de QTL identificaram locos de tolerância ao Al em todos os 12 cromossomos (WU et al., 2000), sugerindo uma herança complexa para a característica. O genoma do arroz está completamente sequenciado e estudos recentes dessas sequências revelaram um gene que codifica para uma proteína de resistência ao Al, *Os04g0636300*, está localizado no cromossomo 4 (OHYANAGI et al., 2006).

A Embrapa e o CIAT vêm investindo esforços no estudo da tolerância ao Al em forrageiras tropicais. O CIAT desenvolveu uma metodologia de fenotipagem em larga escala para análises de progênies (WENZL et al., 2006). Também, esforços têm sido feitos para a descoberta de genes associados a essa característica em diversas gramíneas. Em *Brachiaria* um estudo iniciado em 2007 por membros desta equipe, identificou sequências diferencialmente expressas após tratamento com Al em ápices de raízes de *B. decumbens* cv. Basilisk, usando as técnicas de GeneSnare e pela PCR utilizando primers degenerados desenhados a partir de motivos conservados presentes em domínios de genes de tolerância ao Al conhecidos (dados não publicados). Os produtos amplificados por ambos os métodos foram sequenciados e confrontados com sequências depositadas no GenBank. Algumas sequências apresentam alta similaridade com genes relacionados à tolerância ao Al em outras espécies.

Estresse por Alagamento

A água se constitui num dos elementos mais importantes no processo vital da planta, pois é quem realiza o transporte de nutrientes do solo para as partes aéreas; funciona como regulador térmico, evitando danos por excesso de temperatura; controla o processo de trocas gasosas com a atmosfera e regula a atividade fotossintética das plantas (LARCHER, 2000).

No Brasil, as áreas de pastagens são, na maioria, sujeitas às secas estacionais ou veranicos e, algumas delas, a alagamentos. Segundo Dias-Filho (2005), o excesso de água no solo da pastagem pode ser causado, naturalmente, por períodos chuvosos intensos, má drenagem do solo (e.g., solos com camada subsuperficial de impedimento) e por elevação sazonal do nível de rios e do lençol freático. Entretanto, o pisoteio do gado, o trânsito de máquinas, ou o impacto da chuva no solo descoberto, podem, paulatinamente, comprometer a capacidade natural de drenagem do solo por causa da compactação, tornando o solo da pastagem suscetível à ocorrência de períodos mais frequentes e relativamente mais intensos de alagamento ou encharcamento. Sendo assim, mesmo naqueles locais onde o excesso de água no solo não seja naturalmente esperado, é possível que as práticas vigentes ou passadas de manejo contribuam para que, periodicamente, sejam instaladas condições, muitas vezes visualmente imperceptíveis, de excesso de água no solo. O excesso de água no solo causa redução imediata na troca de gases entre as raízes da planta e o ambiente (ARMSTRONG et al. 1994; KOZLOWSKI, 2005; LIAO; LIN, 2001). A anoxia ou a hipoxia sofrida pelo sistema radicular altera o

metabolismo celular, provocando queda imediata na respiração das raízes, tanto em plantas tolerantes como nas intolerantes (BRAENDLE; CRAWFORD, 1999; LIAO; LIN, 2001). A deficiência de oxigênio reduz a produção de ATP, afetando diversos aspectos do metabolismo celular (FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004; SOUSA; SODEK, 2002). Essa queda na produção de ATP restringe o suprimento de energia para o crescimento das raízes, reduzindo o desenvolvimento geral da planta.

O cultivo de plantas forrageiras tolerantes ao alagamento é a melhor alternativa para regiões sujeitas a inundações periódicas e consideradas pouco produtivas para a pecuária. Em trabalhos pioneiros de Baruch (1994), compararam-se respostas morfofisiológicas de quatro gramíneas forrageiras tropicais (*Brachiaria mutica*, *Hyparrhenia rufa*, *Andropogon gayanus* e *Echinochloa polystachya*) submetidas ao alagamento. Nesses trabalhos foi constatado que *A. gayanus* e *H. rufa* fecham rapidamente seus estômatos sob alagamento, reduzindo a condutância estomática e a fotossíntese líquida. Além disso, em *A. gayanus*, a atividade da desidrogenase alcoólica (ADH) sofreu aumento significativo, indicando maior sensibilidade dessa espécie a esse estresse (maior produção de etanol). Entretanto, em *B. mutica* e *E. polystachya*, espécies típicas de ambientes alagados, a condutância estomática, a fotossíntese líquida e a atividade ADH não diferiram estatisticamente entre plantas alagadas e não alagadas. Tanto *B. mutica* quanto *E. polystachya* apresentaram estruturas adaptativas ao alagamento, tais como raízes adventícias que permitiram melhor difusão de gases na planta.

No Brasil, estudo comparando a tolerância de diferentes espécies de *Brachiaria* ao alagamento do solo foi realizado por Dias-Filho e Carvalho (2000). Nesse trabalho, foi sugerido que a taxa diária de alongamento foliar poderia ser usada como parâmetro indicador precoce da tolerância desses capins ao alagamento do solo. No mesmo estudo, resultados apresentados por Dias-Filho (2005) mostraram que o conteúdo de amido medido nas folhas, dessas forrageiras submetidas ao alagamento, foi inversamente proporcional à tolerância relativa desses capins a esse estresse, sugerindo que, as principais vias de metabolismo de açúcares foram alteradas sob alagamento. A explicação para tal resposta, segundo o autor, seria que nas plantas mais intolerantes a esse estresse, haveria menor demanda de carboidratos pelas raízes, causada pela diminuição no crescimento e metabolismo dessas estruturas. Todos esses eventos causariam acúmulo de fotoassimilados nas folhas, na forma de amido. Estudos já concluídos e em andamento com acessos de capins do gênero *Brachiaria*, principalmente *B. brizantha*, têm mostrado que pode existir grande variabilidade, mesmo dentro da mesma espécie, com relação à tolerância ao alagamento do solo (CAETANO; DIAS-FILHO, 2008; DIAS-FILHO, 2005). Também em *P. maximum* estudos em três cultivares e quatro acessos sob alagamento demonstraram que existe variabilidade genética para essa característica (SILVA et al., 2006, 2009).

Estresse por Déficit Hídrico

Da mesma forma que o alagamento, o déficit hídrico provocado pela seca estacional também influencia a relação entre a água e as trocas gasosas nas plantas. Segundo Kaiser (1987), a deficiência de água pode causar severa inibição da fotossíntese, mesmo em plantas C_4 , como as gramíneas forrageiras tropicais, sobretudo em razão da maior resistência difusiva à entrada do CO_2 . Esses eventos são oriundos da redução da turgescência das células-guarda do estômato seguida pelo fechamento do poro estomático (BARUCH, 1994).

As plantas desenvolvem mecanismos de adaptação à seca como: fechamento estomático (NG et al., 1975; CHAVES, 1991), ajustamento osmótico (THOMAS, 1986; BARKER et al., 1993), ajustamento da parede celular (NEUMANN, 1995), produção de folhas menores (KLAR et al., 1978), redução da área foliar (ROSENTHAL et al., 1987; CHAVES, 1991) e aumento na densidade e profundidade de raízes (DOSS et al., 1960; KANO et al., 1999). No entanto, o fechamento dos estômatos e a redução da área foliar são mecanismos que limitam a produtividade, uma vez que provocam queda na absorção de CO_2 e na interceptação de luz, respectivamente e são mais intensos em plantas C_3 , como as leguminosas dos gêneros *Arachis* e *Stylosanthes*. Quando as células do mesofilo se tornam ligeiramente desidratadas duas respostas ocorrem. Primeiro o ABA armazenado no cloroplasto é liberado para o apoplasto, de modo que o fluxo da transpiração o conduz às células-guarda; segundo, a taxa de síntese líquida de ABA é

incrementada; esta síntese de ABA aumenta depois de iniciado o fechamento estomático e contribui para aumentar ou prolongar o efeito do fechamento inicial ocasionado pelo ABA liberado pelos cloroplastos (LAWLOR; CORNIC, 2002).

A redução no crescimento é um dos mais notáveis efeitos da restrição hídrica sobre as plantas, principalmente causada por uma inibição da elongação da folha e caule quando o potencial hídrico decresce, sendo esse efeito diferente entre espécies. As observações visuais de resistência à seca, em particular, o enrolamento foliar, está relacionado ao potencial hídrico foliar, visto que esse enrolamento depende do potencial de turgor das células bulbiformes. Uma variação no componente osmótico do potencial hídrico foliar poderia influenciar este evidente sintoma do déficit hídrico. O enrolamento foliar pode ser uma estratégia para reduzir a área de transpiração na superfície, mantendo os estômatos em microclima com umidade mais alta, evitando a seca (TURNER; JONES, 1980).

Os genes induzidos pela deficiência hídrica estudados até hoje, na sua maioria, são também induzidos pelo fito-hormônio ácido abscísico (Abscisic Acid - ABA) (BRAY, 1993). Com base nessa informação, ABA é o melhor candidato a ser visto como um segundo mensageiro na mediação entre o sinal ambiental indutivo e a resposta molecular, fisiológica e/ou morfológica (BRAY, 1993). Além das evidências de que o ABA afeta as respostas à seca, à salinidade e ao estresse de frio, também foi demonstrado que está envolvido na embriogênese, na indução de proteínas de reserva da semente, na dormência, na abscisão, na germinação das sementes, no crescimento, no controle da abertura estomática e no geotropismo (ARTECA, 1996).

Muitas das mudanças nos níveis de mRNA observadas durante a seca refletem ativação transcricional (INGRAM; BARTELS, 1996). Tratamento com ABA pode, também, induzir essas mudanças. Assim, sequências de ACN atuando em cis ou trans (cis-/trans-acting elements) envolvidos na expressão gênica induzida pelo ABA podem agora ser estudadas. O elemento cis-mais bem caracterizado no contexto e resposta à aplicação de ABA é o elemento ABRE (ABA Responsive Element), que contém a sequência palindrômica conservada ACGTGGC (ABE et al., 1997). Essa sequência tem sido encontrada na região promotora de genes induzidos pelo ABA (INGRAM; BARTELS, 1996). Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (1999) sugerem que genes induzidos por deficiência hídrica são ativados por duas rotas de percepção e transmissão do sinal de estresse: uma ABA-dependente e outra ABA-independente.

As primeiras plantas geneticamente modificadas para tolerância à seca já estão sendo desenvolvidas com sucesso em laboratório. Estratégias como o uso de moléculas chaperonas, que protegem componentes celulares durante a desidratação (ALVIM et al., 2001), ou estratégias que ampliam o sinal molecular da percepção do estresse hídrico, permitindo a planta antecipar e acelerar os mecanismos de defesa (KASUGA et al., 1999), já são uma realidade. Entretanto, ainda devem ser testados quanto à produtividade nos campos de produção agrícola. Alcançar esses tipo de resultado e obter plantas cada vez mais eficientes na tolerância aos estresses do ambiente somente está sendo possível devido à compreensão dos mecanismos de tolerância.

Genômica Funcional

Os conhecimentos sobre a natureza e conteúdo da informação genética, assim como as tecnologias disponíveis para o sequenciamento de genomas em larga escala, evoluíram de uma forma sem precedentes nas duas últimas décadas, permitindo que os bancos de dados públicos acumulassem um enorme volume de informações acerca das sequências de nucleotídeos de diversos genomas.

Contudo, os dados obtidos nos projetos de sequenciamento não têm contribuído da forma esperada para o melhor entendimento do papel que os genes e as proteínas desempenham no funcionamento dos organismos, uma vez que o genoma é um elemento virtualmente estático, ao passo que seus produtos, representados pelos RNAs mensageiros (transcriptoma) e proteínas (proteoma), possuem um caráter dinâmico, caracterizado por mudanças contínuas em resposta a estímulos internos e externos (GREENBAUM et al., 2001).

Assim sendo, ainda no auge da etapa de sequenciamento de genomas, começaram a surgir novas plataformas de pesquisa que possibilitam posicionar as funções individuais dos genes e seus produtos (RNAs e proteínas) dentro de um contexto global, dando início a um novo campo

de estudos, denominado Genômica Funcional, cujas técnicas analíticas permitem avaliar os padrões de expressão gênica e protéica nas células e tecidos, pré-requisito básico para se entender como estas macromoléculas interagem de maneira dinâmica para produzir organismos complexos, capazes de se adaptar às influências do meio ambiente e a situações fisiológico-metabólicas específicas. Os resultados das pesquisas em Genômica Funcional, notadamente daquelas que envolvem indivíduos geneticamente diferentes ou submetidos a condições contrastantes, têm permitido um entendimento mais rápido e preciso das relações gene-fenótipo, bem como dissecar as interações genótipo-ambientais que ocasionam mudanças significativas no fenótipo dos indivíduos (FURLAN et al., 2007).

Uma abordagem bastante utilizada em genômica funcional é o sequenciamento das Etiquetas de Sequências Expressas ou ESTs (do inglês Expressed Sequence Tags), para caracterizar a expressão temporal e local dos genes estruturais mediante a identificação de seus respectivos RNAs mensageiros.

Devido à grande instabilidade das moléculas de RNA, a estratégia utilizada nessa modalidade de sequenciamento é a utilização do princípio da transcrição reversa para converter o RNA mensageiro em seu DNA complementar (cDNA), que posteriormente terá as extremidades sequenciadas. Essas sequências são então analisadas por programas computacionais (ferramentas de bioinformática) que têm a capacidade de identificar o gene que lhes deu origem. As coleções de ESTs são muito importantes para os estudos de genômica funcional e têm sido largamente utilizadas para identificação de novos genes, mapeamento e anotação de transcritos (SMITH et al., 2001).

As plataformas de sequenciamento de nova geração são uma alternativa poderosa para estudos de genômica funcional. O sistema 454 foi a primeira destas plataformas a ser comercializada. A plataforma 454 realiza o sequenciamento baseado em síntese, o pirosequenciamento (RONAGHI et al., 1998). A leitura da sequência nesse sistema é realizada a partir de uma combinação de reações enzimáticas que se inicia com a liberação de um pirofosfato, oriundo da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia. Em seguida, esse pirofosfato é convertido para ATP, pela ATP sulfurilase, sendo este utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz capturado por uma câmera CCD (charge-coupled device) acoplada ao sistema.

O sistema requer que o DNA seja mecanicamente fragmentado em sequências de 300 – 800pb, transformado em fragmentos abruptos fosforilados e ligado a adaptadores de sequência específica. A biblioteca de DNA da amostra é ligada a adaptadores A e B nas extremidades 3' e 5' dos fragmentos, respectivamente, os quais são utilizados nas etapas posteriores de isolamento dos fragmentos (A-B) e amplificação e nas reações de sequenciamento. As leituras produzidas possuem geralmente cerca de 250pb, o que representa um comprimento de leitura muito menor que o produzido pelo sistema de Sanger (~700pb). A Roche divulgou recentemente o lançamento da série Titanium de pirosequenciamento, em que leituras maiores que 400pb são conseguidas. Esse aprimoramento das leituras advém de otimizações nas reações químicas do pirosequenciamento, as quais reduzem o ruído de fundo e aumentam o número de leituras por corrida, e do novo desenho do suporte de sequenciamento (PicoTiterPlate), o qual agregou duas mudanças principais: o uso de uma estrutura metálica, permitindo leituras mais acuradas, e esferas ainda menores, aumentando, tanto o tamanho das leituras, quanto o número de leituras por corrida (ROCHE, 2008). O maior tamanho das leituras e a grande capacidade de gerar informação tornam o processo de montagem mais fácil num projeto de sequenciamento de novo (sequenciamento de genomas desconhecidos) e permite trabalhar com coberturas genômicas mais amplas, favorecendo o processo de montagem. Além disso, pelo fato de não envolver clonagem bacteriana, a representação do genoma é bem mais fiel, de forma que sequências difíceis de clonar e manter em bibliotecas genômicas podem ser acessadas (CARVALHO; SILVA, 2010).

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

Objetivo Geral

Caracterizar fenotipicamente gramíneas e/ou leguminosas nativas e exóticas divergentes quanto à tolerância ao alumínio, à eficiência de uso aos nutrientes: Ca, Mg e P, ao alagamento e ao déficit hídrico, identificando os genótipos mais contrastantes para a obtenção de populações segregantes para dinamização dos programas de melhoramento; identificar e/ou validar de genes relacionados à tolerância ao alumínio em *Brachiaria* (estudos em andamento), alagamento e seca em *Brachiaria* e *Panicum maximum* e; contribuir para consolidar o uso dessas estratégias de fisiologia e biotecnologia no dia-a-dia dos programas de melhoramento.

Objetivos Específicos

- 1) Fenotipar genótipos (acessos e/ou híbridos) de gramíneas e/ou leguminosas forrageiras nativas e exóticas quanto tolerância ao alumínio, à eficiência de uso aos nutrientes: Ca, Mg e P, ao alagamento e ao déficit hídrico;
- 2) Fenotipar e/ou gerar populações segregantes para os estresses abióticos;
- 3) Validar por PCR em tempo real e hibridização *in situ* genes potencialmente relacionados à tolerância ao alumínio em *Brachiaria decumbens*;
- 4) Mapear QTL's associados à tolerância ao alumínio em *Brachiaria decumbens*;
- 5) Prospectar *in silico* genes potencialmente relacionados a tolerância aos estresses por alumínio em *Brachiaria* e estresses hídricos (seca e alagamento) em *Brachiaria* e *Panicum maximum*;
- 6) Validar em campo a fenotipagem para tolerância ao alumínio;
- 7) Potencializar a interação entre o ensino, pesquisa e extensão, em diferentes instituições do Centro Oeste e do país, em prol da construção de benefícios e sustentabilidade de pastagens com gramíneas nativas e cultivadas selecionadas;
- 8) Treinar pessoal e formar pesquisadores competentes e capazes de incrementar o desenvolvimento científico da região Centro-Oeste.

Metas

Objetivos	Metas	Indicadores/Aferição
Fenotipar genótipos (acessos e/ou híbridos) de gramíneas e/ou leguminosas forrageiras nativas e exóticas quanto tolerância ao alumínio, à eficiência de uso aos nutrientes: Ca, Mg e P, ao alagamento e ao déficit hídrico	Avaliação da tolerância ao alumínio tóxico em gramíneas e leguminosas forrageiras nativas e exóticas e a eficiência de uso aos nutrientes, ao alagamento e ao déficit hídrico	Acessos/híbridos avaliados.
Fenotipar e/ou gerar populações segregantes para os estresses abióticos	Gerar e avaliar populações segregantes para os estresses abióticos	Populações geradas e avaliadas.
Validar por PCR em tempo real e hibridização <i>in situ</i> genes potencialmente relacionados à tolerância ao alumínio em <i>Brachiaria decumbens</i>	Avaliação do padrão de expressão gênica de sequências diferencialmente expressas potencialmente relacionadas à tolerância ao alumínio em <i>B. decumbens</i>	Padrão de expressão determinado
Mapear QTL's associados à tolerância ao alumínio em <i>Brachiaria decumbens</i>	Construção de um mapa genético de <i>B. decumbens</i> e localização de QTLs potencialmente relacionados a tolerância ao alumínio nessa espécie	Mapa construído e QTLs identificados
Prospectar <i>in silico</i> genes potencialmente relacionados a tolerância aos estresses por alumínio em <i>Brachiaria</i> e estresses hídricos (seca e alagamento) em <i>Brachiaria</i> e <i>Panicum maximum</i> ;	Obtenção de milhares de ESTs de plantas submetidas e não submetidas aos estresses estudados e identificação <i>in silico</i> de ESTs potencialmente relacionadas a esses estresses	ESTs potencialmente relacionadas à tolerância aos estresses identificadas por ferramentas de bioinformática
Validar em campo a fenotipagem para tolerância ao alumínio	Avaliação em campo dos materiais contrastantes a tolerância ao alumínio tóxico em gramíneas e leguminosas forrageiras nativas e exóticas	Materiais avaliados e correlação estabelecida com a fenotipagem em solução nutritiva
Potencializar a interação entre o ensino, pesquisa e extensão, em diferentes instituições do Centro Oeste e do país, em prol da construção de benefícios e sustentabilidade de pastagens com gramíneas nativas e cultivadas selecionadas	Estabelecer parcerias com universidades e institutos de pesquisa	Parcerias estabelecidas
Treinar pessoal e formar pesquisadores competentes e capazes de incrementar o desenvolvimento científico da região Centro-Oeste.	Treinamentos de Mestrados e recém-graduados	Estudantes treinados.

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

O projeto de pesquisa intitulado “Estratégias de fenotipagem e biotecnologia para a caracterização de forrageiras nativas e exóticas quanto à tolerância a estresses abióticos visando à adaptação às mudanças climáticas e a solos ácidos e de baixa fertilidade”, a ser realizado no bioma cerrado de Mato Grosso do Sul, é o projeto 3, o qual fará parte da Rede Desenvolvimento de cultivares forrageiras nativas e cultivadas: mudanças climáticas e produção sustentável de proteína animal, conforme pode ser observado na Figura 1.

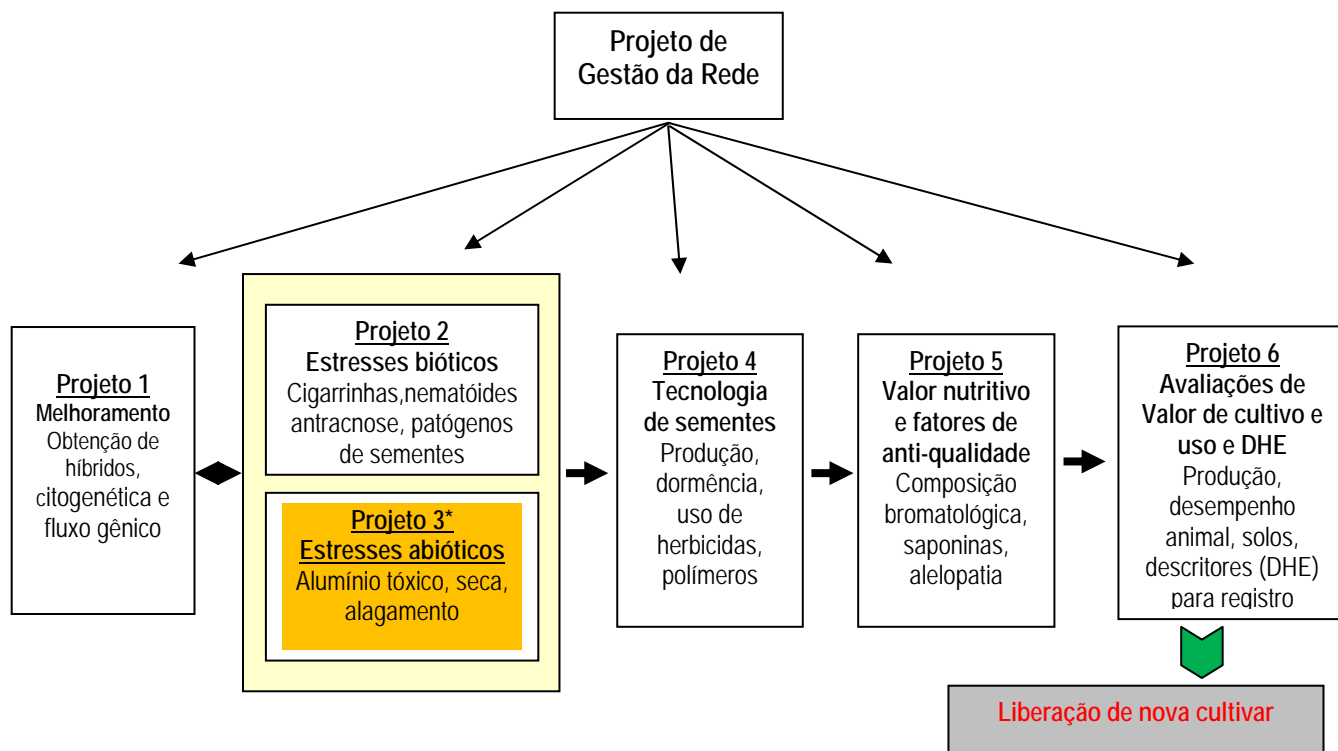


Figura 1. Integração entre os Projetos da Rede: “Desenvolvimento de cultivares de forrageiras nativas e exóticas: mudanças climáticas e produção sustentável de proteína animal”.

* **Projeto 3** – Estresses abióticos: refere-se a [esta proposta](#).

g) metodologia a ser empregada

O Projeto será constituído por nove experimentos, descritos individualmente, mas com intensa interação da equipe, conforme é apresentado a seguir.

Materiais Genéticos

Os genótipos das forrageiras nativas e exóticas [gramíneas (*Brachiaria* spp. e *Panicum maximum*) e leguminosas (*Arachis* spp. e *Stylosanthes* spp.)] que serão avaliadas neste projeto serão provenientes dos programas de melhoramento ou dos bancos de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, Embrapa Acre e Embrapa Cerrados. Dado o perfil do projeto, serão avaliados predominantemente genótipos que apresentam respostas divergentes à exposição aos estresses ou são amostras representativas da variabilidade de coleções de trabalho. A escolha basear-se-á-se nos registros de experimentos ou de

caracterizações anteriores. Deste modo, as avaliações não se restringirão apenas aos genótipos agronomicamente superiores.

A população segregante utilizada para o mapeamento de QTLs ou de genes de efeito maior relacionados ao estresse por alumínio está disponível na Embrapa Gado de Corte e deriva de cruzamento intra-específico de *B. decumbens*, realizado entre uma planta sensível (sexual) e uma planta tolerante (apomítica), seguindo o delineamento tipo pseudo-testcross. As populações segregantes a serem desenvolvidas para tolerância ao alagamento e para tolerância ao déficit hídrico também seguirão este delineamento e serão bases para estudos dessas características em trabalhos posteriores.

Experimento 1. Avaliação da tolerância ao alumínio tóxico em forrageiras nativas e exóticas

Serão fenotipados 40 genótipos de cada gênero de gramínea (*Brachiaria* spp. e *Panicum maximum*) e 20 genótipos de cada gênero de leguminosa (*Arachis* spp. e *Stylosanthes* spp.)] quanto a tolerância ao alumínio em solução, em condições semi-controladas (casa-de-vegetação) e condição controlada (câmara de crescimento, tipo fitotron).

Em condições semi-controladas os genótipos serão avaliados de acordo com a metodologia proposta Wenzl et al. (2006), que foi desenvolvida pelo CIAT para espécies de *Brachiaria*, e as descritas por Camargo e Oliveira (1981), Oliveira et al. (2000) e Huttová et al. (2002), com as devidas modificações. Serão avaliadas diferentes concentrações de alumínio em solução, considerando-se que as espécies a serem estudadas apresentam um amplo nível de tolerância e que, dentro de cada espécie, serão avaliados genótipos abrangendo uma grande variabilidade genética. O pH em todos os experimentos será monitorado diariamente e ajustado para pH 4,2, também haverá ajuste da solução sempre que necessário. Como critério de avaliação da tolerância ao Al será utilizado a medição do sistema radicular (crescimento relativo da raiz e diâmetro médio). A metodologia será ajustada para essas espécies forrageiras de forma a permitir comparação mais segura dos resultados entre as espécies.

Em condições controladas, serão avaliados os mesmos genótipos de cada gênero, que serão inicialmente cultivados em solução de Hoagland aerada, em meia-força (SIMON et al., 1994; PASSOS, 1996), durante quatro dias. Plantas padronizadas quanto ao vigor serão testadas quanto à toxidez por Al (0 ou 6 mg/L de Al³⁺), conforme Passos et al. (2004) durante 10 dias, com monitoramento do pH (em 4,3 ou menor) e reposição da solução nutritiva a cada dois dias. O cultivo será realizado em câmara de crescimento (280 $\mu\text{mol/s.m}^2$ de irradiância, 30 \pm 4°C, 82 \pm 6% de U.R. e 16 horas de fotoperíodo). Serão efetuadas as seguintes avaliações: alongamento relativo da raiz (ARR), comprimento do colmo/altura da planta, peso fresco da raiz, peso fresco do colmo/caule, peso fresco de folhas e peso fresco total, parâmetros foliares (largura e comprimento do limbo, área, taxa transpiratória e teor de clorofila), potencial osmótico e teor de carboidratos não estruturais, conforme Passos et al. (2006). Para as análises estatísticas, será considerado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com um fatorial, para cada espécie ou classe de híbridos em estudo, genótipos X níveis de alumínio, e quatro repetições. As médias serão comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$), para o agrupamento das combinações genótipo X níveis de alumínio em clusters homogêneos.

Além dos genótipos do germoplasma serão também fenotipados uma população segregante para tolerância ao alumínio (*B. decumbens* x *B. decumbens*), contendo 170 híbridos, será caracterizada fenotipicamente quanto à tolerância a esse estresse. Os

resultados serão utilizados para mapeamento de QTLs e/ou genes relacionados com a tolerância ao Al em *Brachiaria*.

Experimento 2. Validação da avaliação da tolerância ao alumínio tóxico em gramíneas forrageiras nativas e exóticas

A validação será efetuada apenas para as gramíneas e em duas etapas: uma em casa-de-vegetação, e outra em parcelas no campo, na Embrapa Gado de Corte. Em casa-de-vegetação serão utilizados vasos com capacidade de 2,0 a 3,0 kg, e em campo, parcelas de 24 m², sendo o solo estudado um Latossolo Vermelho distrófico (EMBRAPA, 1999). O mesmo será seco ao ar, peneirado em malha de 2 mm. Suas características são as seguintes: textura franco-argilosa (39% de argila); pH CaCl₂=4,26; Ca⁺⁺=0,12; Mg⁺⁺=0,15; K⁺=0,17; Al⁺⁺⁺=0,80 e H+Al=8,53 cmol_c/dm³; M.O.=4,50 dag/dm³; P-Mel-1=1,10 mg/dm³; V=4,98%. O solo, em suas diferentes etapas, será analisado de acordo com EMBRAPA (1997). Depois de peneirado, o solo passará por duas etapas de processamento. Uma em que receberá, em vasos de 2,0 kg de capacidade, o equivalente a cinco doses de calcário: 0, 500, 1000, 2000, 4000 e 8000 kg/ha. Nestes tratamentos, os demais nutrientes serão aplicados em níveis não limitantes (adubação básica complementar - abaixo relacionada), e será validada a resposta dos materiais pré-selecionados no experimento em solução nutritiva específica. Serão avaliados 10 genótipos/gênero, em um Latossolo com 50% saturação de Al, típico da região do Cerrado. As diferentes saturações de bases e de alumínio, estabelecidas pelas doses crescentes de calcário serão referências para validação dos genótipos classificados e selecionados na etapa anterior (teste de solução nutritiva). Em uma segunda etapa, ainda em condições de casa-de-vegetação, outros vasos receberão duas doses de calcário dolomítico (98% de PRNT) equivalentes para estabelecerem níveis de 35 e 50% de saturação por bases no solo. Estes níveis caracterizam pelos limites inferiores e superiores para as forrageiras pouco exigentes e exigentes, de acordo com Vilela et al. (2004). O solo nos vasos será incubado por 35 dias, sob um regime hídrico mantido a 80% da porosidade total. Em seguida, o solo será seco ao ar e aplicados os tratamentos de doses de adubação fosfatada de 0, 40 e 400 kg/ha de P₂O₅, utilizando-se como fonte de fósforo o KH₂PO₄. Essas doses foram estabelecidas com base em estudos prévios de incubação e curva de resposta à adubação de forrageiras (Macedo, 2004) que demonstraram ser a dose de 40 kg parte integrante da faixa máxima de resposta, e a de 400 kg parte integrante da assíntota da curva de produção forrageira. Como adubação básica complementar aplicar-se-á: N (100 kg/ha); K₂O (72 kg/ha); S (60 kg/ha), e micronutrientes: Zn, Cu, B e Mo, (4; 4;1 kg/ha, e 400 g/ha, respectivamente). As fontes serão: uréia, cloreto de potássio, enxofre elementar, sulfato de zinco e de cobre, bórax e molibdato de amônio, respectivamente. Os materiais genéticos analisados terão dois cultivares testemunhas para cada gênero: *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk e *B. ruziziensis* cv comum, para o gênero *Brachiaria*, e *Panicum maximum* cv Tanzania e cv Massai, para o gênero *Panicum*. Nesta fase serão testados cinco genótipos/gênero. Os materiais serão semeados em vasos para se obter pelo menos cinco plantas úteis/vaso aos 20 dias da semeadura. A partir desse ponto, e com 45 da semeadura, se efetuará o primeiro corte de avaliação, um segundo corte será efetuado após 46 dias do primeiro corte, e um terceiro e último depois de 45 dias do segundo corte. Após cada corte serão efetuadas adubações de manutenção equivalentes a 150 kg/ha de N e de K₂O, na forma de uréia e cloreto de potássio, respectivamente. Os vasos terão umidade controlada durante o experimento, seguindo-se o critério de manutenção de 80% da porosidade total do solo, após pesagem por amostragem, e equilíbrio de umedecimento por vaso. Antes dos cortes de avaliação será contado o número de perfilhos por vaso, e após o corte e separação morfológica da planta, e secagem em

estufa, avaliar-se-á a massa seca das folhas, dos pseudocaulos (colmo+bainha), e da massa seca total. Após o terceiro corte, o solo será separado das raízes em peneiras de malha de 1,0 e 0,25 mm, e as raízes lavadas em água corrente, postas a secar a 60°C, e pesadas para avaliação da massa seca total. O delineamento experimental será de blocos ao acaso, sendo os tratamentos combinados em um fatorial de x tratamentos: y de calagem e z de doses de P₂O₅, com quatro repetições, de acordo com cada etapa do trabalho. Os blocos serão distribuídos na casa de vegetação, nas posições leste e oeste, de forma a receberem luz e ventilação de forma equitativa. A partir do segundo ano, os materiais selecionados em casa de vegetação, de acordo com a tolerância a acidez e eficiência de resposta ao P, em número de seis genótipos, mais as testemunhas, serão levados para avaliação de campo em parcelas de 24 m² (4 m x 6 m), onde receberão os mesmos tratamentos de calagem (níveis de saturação por bases) e níveis de P₂O₅. A semeadura será em novembro/dezembro e após um corte de uniformização aos 45-60 dias serão efetuados cortes de avaliação a cada 45 dias. As mesmas variáveis serão consideradas, agora sob as condições de campo e de pleno crescimento, sem limitação ao desenvolvimento do sistema radicular. As plantas, tanto na casa-de-vegetação, quanto em campo terão suas partes aéreas (folhas e colmos) analisadas para macro e micronutrientes, com ênfase no Ca, Mg e P. Os teores serão analisados em sua concentração e quantidades extraídas calculadas em base da unidade experimental (vasos e área). Cálculos de eficiência de produção em função dos teores no solo e por unidade de massa seca produzida serão efetuados para se estabelecer índices de eficiência de extração e produção. As variáveis estudadas serão analisadas por análise de variância, e as médias testadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o procedimento GLM do aplicativo SAS (1996). A condução desta validação fornecerá importantes subsídios aos testes de condições controladas, podendo em futuro próximo abreviar consideravelmente o processo de seleção de genótipos quanto à tolerância a acidez e eficiência de uso de nutrientes em solos de baixa fertilidade.

Experimento 3. Avaliação da tolerância ao alagamento em gramíneas e leguminosas forrageiras nativas e exóticas

Serão avaliados 40 genótipos de cada gênero de gramínea (*Brachiaria* spp. e *Panicum maximum*) e 20 genótipos de cada gênero de leguminosa (*Arachis* spp. e *Stylosanthes* spp) conforme a metodologia descrita por Costa (2004) e por Zhou et al. (2007), na qual as plantas são expostas ao alagamento por períodos de até 90 dias. As sementes de cada genótipo serão germinadas em bandejas de poliestireno expandido (isopor), em células individuais e, 15 dias após a emergência, serão transplantadas para caixas plásticas de 100 cm x 50 cm x 47 cm, contendo solo analisado, preparado e homogeneizado para essa experimentação. Será instalado um sistema similar ao descrito por Platzeck (1989) e Costa (2004), com reservatório de água e uso de tubos de PVC para distribuição uniforme de água nas caixas, as quais serão as unidades experimentais. Nesse procedimento, após estabelecimento das plântulas, será mantida uma lâmina d'água de 5,0 cm em todas as caixas "alagadas" por um período a ser determinado, até o aparecimento dos sintomas de estresse, aproximadamente 90 dias. O experimento será delineado em blocos, com quatro repetições e dez plantas por parcela, espaçadas de 10 cm. A fotossíntese líquida e condutância estomática serão medidas semanalmente após a imposição dos tratamentos utilizando medidor portátil de fotossíntese (LI-6400, Li-Cor, Inc. EUA), equipado com uma fonte artificial de luz, ajustada para 1000 micromol/m²/s; assim como o número de perfilhos por planta, a altura da planta e o número de folhas vivas do perfilho principal. No início e ao final do ensaio, a massa seca total das plantas será

determinada, através da colheita e secagem das folhas, colmos e raízes em estufa a 65°C por 48 horas. Esses dados serão utilizados para cálculo da taxa de crescimento relativo e razão de massa foliar, do colmo e radicular. No final do ensaio, será avaliada a produção de raízes adventícias e o número de perfilhos por planta. Todos os dados serão testados para homogeneidade de variâncias e, quando necessário, sofrerão transformação. Na avaliação serão identificados os genótipos com maior tolerância ao alagamento. Os dados serão analisados empregando-se o software Selegen Reml/Blup (RESENDE, 2002).

Os genótipos mais contrastantes serão avaliados em campo para validação dos resultados.

Experimento 4. Avaliação da tolerância ao déficit hídrico em gramíneas e leguminosas forrageiras nativas e exóticas

Serão avaliados 20 genótipos de cada gênero: *Arachis*, *Stylosanthes*, *Brachiaria*, e *Panicum*.

No experimento, em casa-de-vegetação será utilizado um delineamento de blocos casualizados, com três repetições e parcelas de uma planta/vaso em um esquema fatorial 20 (genótipos) x 2 (níveis de água no solo) x 5 (épocas de colheita). Os genótipos serão mantidos no solo sem o estresse (mantidos durante todo o período na capacidade de campo) e com o estresse (o fornecimento de água será interrompido 30 dias após o estabelecimento). A colheita das plantas para avaliação da biomassa será feita aos 10, 20, 30, 40 e 50 dias após a interrupção da irrigação. Serão utilizados tensiômetros para acompanhamento da umidade do solo. A relação tensão x umidade do solo será determinada pela curva de retenção de água. A cada época de colheita, serão retiradas amostras de solo para determinar a umidade. O material será colocado em estufa a 110°C por 24 horas. Serão utilizados vasos plásticos com capacidade de 5,0 L de material de solo, onde serão colocados o solo previamente seco e peneirado em peneira de 2 mm de diâmetro. Este solo terá sua acidez corrigida e será adubado (adubação de estabelecimento) de acordo com o resultado da análise de solo. As sementes de cada genótipo serão germinadas em bandejas de poliestireno expandido (isopor), em células individuais e, 15 dias após a emergência, após seleção para padronização do tamanho da parte aérea e sistema radicular, serão transplantadas para os vasos plásticos, com o solo na capacidade de campo, determinada pelo método do funil (LUCHESE et al., 2001).

Os vasos terão o solo mantido na capacidade de campo até 30 dias de estabelecimento, quando haverá a supressão no fornecimento de água para os tratamentos com estresse hídrico. No momento de supressão do fornecimento de água e a cada 10 dias serão realizadas a estimativa de clorofila presente nas folhas com um clorofilômetro (SPAD-502), o número de folhas e perfilhos por vaso, a área foliar, o comprimento e a largura dos folíolos e o grau de perda de folhas. Nas épocas de colheita, será determinada a biomassa da parte aérea (folhas e caules) e do sistema radicular, e calculada a relação parte aérea/raiz. A determinação da massa seca da parte aérea e do sistema radicular será realizada após pesagem do material verde e o seu acondicionamento em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada de ar, por 96 horas, a 55°C. Os resultados coletados serão submetidos à análise de variância e de regressão e as médias, quando necessário, serão comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

Experimento 5. Geração de populações segregantes de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum* para estudo da tolerância aos estresses hídricos (alagamento e déficit hídrico)

Serão obtidas progênes de irmãos completos por meio de cruzamentos controlados entre genitores apomíticos e sexuais de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum*, previamente caracterizados e contrastantes para tolerância ao alagamento ou ao déficit hídrico. Para a realização dos cruzamentos artificiais em casa de vegetação, as plantas-mãe estarão em vasos e o pólen será coletado fresco de inflorescências colhidas e mantidas em vasos com água no laboratório. O pólen será recolhido em uma placa de Petri até sua utilização nos cruzamentos no mesmo dia. A polinização ocorrerá após uma leve fricção do rácemo feminino contra os grãos de pólen na placa de Petri. Após, a inflorescência feminina será ensacada para identificação do cruzamento e a coleta das sementes será feita 21 dias depois desta polinização. As sementes serão germinadas. Após a obtenção das sementes e germinação, serão feitas avaliações da natureza híbrida usando marcadores moleculares. Essas populações serão úteis para estudos da herança desta característica, ainda desconhecida para estas importantes gramíneas forrageiras tropicais e para mapeamento de QTLs e/ou genes relacionados a esse estresse. Ademais, servirão para gerar variabilidade que poderá ser explorada pelo programa de melhoramento genético desses gêneros.

Experimento 6. Avaliação da expressão de genes, prospectados em *B. decumbens*, potencialmente relacionados à tolerância ao AI por qRT-PCR

Para estas análises, o RNA total será extraído de ápices de raízes de *B. decumbens* cv. Basilisk (tolerante ao AI) expostas e não-expostas ao estresse por AI conforme metodologia descrita por WENZL et al. (2006), utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) baseando-se no protocolo do fabricante. Após o tratamento com DNase (Ambion) para eliminação de possíveis contaminações, o RNA total será avaliado qualitativamente em gel de agarose 1% e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo), sendo a concentração calculada em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ através da fórmula: $[\text{RNA}] = A_{260} \times Fc \times fd$. Onde A_{260} corresponde ao valor de absorvância da amostra ao comprimento de onda de 260 nm; Fc corresponde ao fator de conversão que para RNA é 40; fd corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura, que neste caso será 100; e o resultado será a concentração em $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$. A qualidade do RNA será analisada com base na razão da absorvância $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$.

As reações de PCR em tempo real (RT-PCR) serão conduzidas em equipamento Step one ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). A amplificação dos genes alvos será realizada utilizando-se a metodologia SYBR Green. Como referência endógena serão testados quatro genes (Ubiquitina, Glicose 6 Fosfato Desidrogenase, rRNA 18S, Alfa Tubulina, Fator de Iniciação Eucariótico, Enzima de Conjugação A Ubiquitina). A amplificação dos genes alvos e da 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 será 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. Serão adicionados 2 μL da reação da primeira fita do cDNA, 0,2 a 0,4 pmoles de cada primer e 12,5 μL do tampão SYBR Green *master mix*, que conterá todos os componentes necessários à amplificação (as enzimas uracil N-glicosilase e

AmpliTa_q 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 alvos será realizada pela quantificação relativa utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Os dados serão coletados, armazenados e analisados no programa 7500 Fast Software (Versão 2.0.1). As amostras serão processadas em triplicatas biológicas e técnicas. Os resultados serão normalizados usando 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 $\Delta CT = CT(\text{gene alvo}) - CT(\text{controle endógeno})$ é o CT do gene alvo subtraído do valor do CT do controle endógeno, para normalizar a reação. Este valor é utilizado na fórmula do nível de expressão fórmula 2 - ΔCT , 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.

Experimento 7. Localização da expressão de genes potencialmente relacionados à tolerância ao alumínio, já identificados em ápices radiculares de *B. decumbens*

A expressão de genes potencialmente relacionados à tolerância ao alumínio em *B. decumbens*, será analisada por hibridização *in situ* utilizando sondas de mRNA marcadas com digoxigenina. Ápices radiculares de *B. decumbens* cv. Basilisk serão coletados e fixados em tampão fosfato contendo paraformaldeído e glutaraldeído por 4 h. Após a fixação o material será lavado em tampão e desidratado. Será realizada inclusão em paraplast[®]. Secções de 5-7 µm serão retiradas e montadas em lâminas tratadas, livres de RNase. O paraplast[®] será removido em xilol. Para a obtenção das sondas senso (controle negativo) e antisenso, plasmídeos pGEM[®]-T contendo as sequências de cDNA, dos genes selecionados, serão linearizados. As sondas serão sintetizadas utilizando o “Digoxigenin mRNA labeling kit” da Roche. A hibridização e pós-hibridização serão feitas como descrito por Dusi (2001). Lâminas provenientes da hibridização serão montadas em água ou DEPEX para análises utilizando microscópio de luz. Os resultados serão documentados em fotografias.

Experimento 8. Construção de um mapa genético visando à identificação regiões do genoma de *Brachiaria decumbens* associadas à tolerância ao Al por meio de mapeamento de QTLs

Serão utilizados 170 híbridos pertencentes da progênie F₁ intra-específica de *B. decumbens* segregante para a tolerância ao Al, que será fenotipada conforme já descrito. Marcadores microssatélites desenvolvidos para *B. decumbens* e disponibilizados pelo CIAT (80 SSR já disponíveis) serão testados nos parentais da população, de modo a identificar ao menos 150 marcadores que sejam polimórficos entre os dois genitores. Os microssatélites polimórficos serão utilizados na genotipagem dos indivíduos da progênie. As reações de PCR serão feitas utilizando-se DNAs extraídos de folhas jovens segundo o método descrito por Doyle e Doyle (1987) em volume final de 25 µl contendo 20 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 50 ng DNA genômico; 0,8 µM cada primer; 150 µM dNTPs e 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), em programa consistindo de um ciclo inicial de

desnaturação de 94°C (1 min), seguido de 30 ciclos de amplificação [94°C (1 min), X°C (1 min), 72°C (1 min)] e uma etapa final de extensão de 72°C (7 min), sendo X°C a temperatura específica de cada primer. Os primers utilizados serão marcados com fluorescência (6-FAM e HEX). Os produtos de amplificação serão submetidos à eletroforese em géis de poli(acrilamida) corados com prata (seleção de primers nos genitores) e eletroforese capilar (indivíduos da progênie) utilizando-se sequenciador automático Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems).

O mapa de ligação será construído com base nos marcadores SSR polimórficos que apresentarem segregação mendeliana. As análises serão executadas com o auxílio do programa GQMol (www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm), utilizando LOD > 3,0 e máxima frequência de recombinação de 0,3, cujas distâncias em centiMorgans (cM) serão estimadas pela função de Kosambi (1944). Associações entre os marcadores moleculares e a tolerância ao alumínio serão detectadas através de análise de regressão simples e múltipla pelo modelo stepwise, em que os marcadores são considerados como variáveis independentes. O coeficiente de determinação (R^2) será utilizado para estimar a proporção de variação fenotípica explicada pelos marcadores e o coeficiente de regressão indicará o efeito de cada marcador no valor médio de cada característica. Análises de regressão simples e múltiplas serão realizadas com o auxílio do programa Jump v 3.1.6.2 (SAS Institute Inc., 1995). A proporção de variação genotípica explicada por cada marcador significativamente associado à tolerância ao Al será estimada dividindo o coeficiente de determinação (R^2) pela herdabilidade da característica utilizando a média familiar (h^2_m) (AUSTIN; LEE, 1998). As análises de mapeamento por intervalo Lander e Botstein (1989) e de mapeamento por intervalo composto (JANSEN; STAM, 1994; ZENG, 1994) serão realizadas com auxílio dos programas QTL Cartographer (BASTEN et al., 1996) e GQMol (www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm). O limite de significância para a detecção de QTL será calculado utilizando 10.000 permutações ao acaso com $\alpha=0,05$, como sugerido por Doerge e Churchill (1996).

Experimento 9. Obtenção de ESTs de *Brachiaria* e *Panicum maximum* em resposta ao Al tóxico, alagamento e seca

Serão utilizados os genótipos classificados como tolerantes aos estresses por alumínio, seca e alagamento. Plantas serão crescidas nas condições com e sem estresse, segundo as metodologias descritas e nos tempos determinados. Amostras de folhas e raízes serão coletadas para extração do RNA total, em pelo menos quatro tempos, sendo que o primeiro será no início do experimento. Para todos os tempos teremos amostras expostas e não-expostas ao estresse. O RNA total será extraído utilizando o reagente Trizol baseando-se no seguinte protocolo do fabricante. Após a extração, o RNA será tratado com DNase para eliminação de possíveis contaminações e será avaliado qualitativamente em gel de agarose 1% e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo), sendo a concentração calculada em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ através da fórmula: $[\text{RNA}] = A_{260} \times F_c \times f_d$. Onde A_{260} corresponde ao valor de absorvância da amostra ao comprimento de onda de 260 nm; F_c corresponde ao fator de conversão que para RNA é 40; f_d corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura, que neste caso foi de 100; e o resultado é a concentração em $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$. A qualidade do RNA foi analisada com base na razão da absorvância $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$. O cDNA será obtido pela reação com a enzima transcriptase reversa Superscript (Invitrogen), seguindo a instrução do fabricante. Os sequenciamentos serão realizados na plataforma 454 da Roche, serviço contratado, na Universidade Católica de Brasília (UCB). As sequências geradas serão avaliadas com ferramentas de bioinformáticas pelos parceiros da UCB e da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. As análises bioinformáticas

incluem (i) extração de sequências a partir dos dados brutos do sequenciador; (ii) montagem do transcriptoma; (iii) anotação de sequências contra bancos de dados públicos; (iv) transcriptômica comparativa entre fases e tecidos; (v) transcriptômica comparativa contra genomas e transcriptomas de outras plantas já sequenciadas; (vi) descoberta de genes diferencialmente expressos em condições testadas e (vii) análises estatísticas dos dados obtidos.

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

Nos programas de melhoramento de forrageiras, o período entre a coleta dos acessos e o lançamento de uma cultivar comercial é longo e variável. O custo desses programas é elevado, principalmente nas fases finais, quando são necessários experimentos com animais. O produto desta proposta será um conjunto de ferramentas para caracterização fenotípica e/ou genotípica de acessos e híbridos de diversas espécies forrageiras nativas e exóticas (gramíneas e leguminosas) com relação a importantes características relacionadas ao uso eficiente dos sistemas produtivos e adaptação às mudanças climáticas que auxiliarão aos programas de melhoramento e seleção de novas cultivares.

Os principais impactos serão: o encurtamento das fases de seleção de acessos e de híbridos melhor adaptados aos fatores de estresse abióticos (AI, alagamento e déficit hídrico) e a redução do custo total do programa de melhoramento e seleção de novas cultivares, pela assistência da fisiologia vegetal e/ou biologia molecular.

No momento em que as informações geradas pelo projeto forem utilizadas para o desenvolvimento e seleção de cultivares forrageiras, serão observados impactos indiretos, como: a redução da vulnerabilidade da cadeia de produção de carne bovina frente às mudanças climáticas globais e o fortalecimento da indústria brasileira de sementes de forrageiras tropicais, já que o Brasil é o maior produtor e exportador de sementes de forrageiras tropicais no mundo. O desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições de estresses abióticos dará uma vantagem competitiva a estas indústrias. A menor vulnerabilidade da cadeia de produção de carne bovina e o fortalecimento da indústria de sementes de forrageiras irão garantir (e até ampliar) o número de empregos nestas cadeias produtivas, tendo reflexos na qualidade de vida das pessoas, principalmente nas regiões mais dependentes da atividade pecuária. O desenvolvimento de cultivares melhor adaptadas às condições de estresse também reduzirá o risco de degradação de pastagens resultando em impactos ambientais positivos.

Além do aspecto técnico, o projeto, através da aproximação e intensificação das relações com os programas de Pós-Graduação, estará qualificando técnicos para atuar nessa área, tão carente de mão de obra especializada.

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

Orçamento	Trimestre				Total
	Ano 1	1º	2º	3º	
Material de consumo	37.160,00	9.500,00	2.000,00	8.750,00	57.410,00
Equipamentos	81.800,00		90.000,00		171.800,00
Diárias		2.950,00		1.300,00	4.250,00
Passagens		1.200,00		4.000,00	5.200,00
Pg. terceiros PJ		1.500,00			1.500,00
Pg. terceiros PF			1.800,00	1.800,00	3.600,00
Total	118.960,00	15.150,00	93.800,00	15.850,00	243.760,00

Orçamento	Trimestre				Total
	Ano 2	1º	2º	3º	
Material de consumo	16.000,00	141.500,00	12.500,00	84.000,00	254.000,00
Equipamentos		120.000,00			120.000,00
Diárias		1.950,00	1.950,00	1.300,00	5.200,00
Passagens		3.600,00	3.600,00	4.000,00	11.200,00
Pg. terceiros PJ			101.500,00	54.500,00	156.000,00
Pg. terceiros PF			900,00	900,00	1.800,00
Total	16.000,00	267.050,00	120.450,00	144.700,00	548.200,00

Orçamento	Trimestre				Total
	Ano 3	1º	2º	3º	
Material de consumo	63.200,00	8.700,00	6.500,00	4.500,00	82.900,00
Equipamentos	3.000,00				3.000,00
Diárias	1.300,00	2.550,00	1.400,00		5.250,00
Passagens	2.400,00	3.800,00	3.600,00		9.800,00
Pg. terceiros PJ	3.800,00	700,00	2.500,00	500,00	7.500,00
Pg. terceiros PF			900,00	900,00	1.800,00
Total	73.700,00	15.750,00	14.900,00	5.900,00	110.250,00

ORÇAMENTO CONSOLIDADO

Material Bibliográfico	0,00
Custeio	566.510,00
Diárias	14.700,00
Passagens	26.200,00
Equipamentos e Material permanente	294.800,00
Total	902.210,00
Bolsas	70.560,00
Total GERAL	972.770,00

EQUIPAMENTOS SOLICITADOS:

1. Um sistema para digestão de amostras de tecido vegetal composto de um forno de micro-ondas, com rotor de 24 tubos de teflon, e sensores para tomada de temperatura e pressão, modelo de referencia Ethos-1, da Milestone. O preço estimado para importação direta é de 30 mil euros. Com custos adicionais de importação: frete, armazenagem, aduana etc. perfaz um total de R\$ 90.000,00;
2. Um Sun Fire X4470 - Processador: 4 Intel Xeon X7560, 8-Core, 2.26 GHz, 130W, Memória: 256 GB (32 x 2 x 4 GB DIMMs) DDR3 1066 MHz, Storage: 6 x 300 GB 10000 rpm 2.5-Inch SAS Disks, - Drive óptico: 1 x DVD-RW, - Placa de rede: 4 x 10/100/1000 Ethernet, 10 PCIe, - Energia: 2 x 100-240 V AC, - Especificações físicas: 3 Rack Units, - Sistemas operacionais: Runs Solaris, Linux, Windows, VMware, - Garantia: 1 ano e dois microcomputadores e dois nobreaks (R\$ 120.000,00, com os custos de importação);
3. Seis mesas de Hidroponia, modelo caseira para 150 plantas (R\$ 450,00 X 6 = R\$ 2.700,00);
4. Uma Balança analítica digital (R\$ 7.100,00);
5. Uma máquina de gelo em escamas (R\$ 13.000,00);
6. Termociclador para PCR em tempo real (R\$ 62.000,00).

JUSTIFICATIVAS PARA AQUISIÇÃO:

Equipamento 1. A Embrapa Gado de Corte vem envidando esforços no sentido de melhorar a eficiência e a qualidade das análises químicas de tecido vegetal em seus laboratórios. A metodologia utilizada atualmente faz uso de grandes quantidades de ácidos perigosos, tais como: o ácido perclórico e o nítrico, agentes poluidores, e de aquisição controlada pelo Exército e Polícia Federal. Exigências trabalhistas e riscos de insalubridade são metas

prioritárias que devem ser consideradas cada vez mais no dia a dia da pesquisa. Este sistema solicitado permite uma grande economia de tempo, energia, e no uso dos ácidos, praticamente eliminando o uso do ácido perclórico, agilizando o trabalho e diminuindo o risco operacional para cerca dos 25% do existente. Igualmente, a utilização do equipamento será de grande valia para outros projetos componentes desta rede de desenvolvimento de forrageiras, que utilizarão os mesmos laboratórios. Dela fazem parte projetos de avaliação do valor nutritivo e de avaliação de cultivo e uso para o lançamento de novos cultivares forrageiros. Os mesmos dependem de várias determinações que exigem digestão ácida para avaliação química de tecido vegetal e serão beneficiados com a utilização deste equipamento. Outros projetos da Embrapa Gado de Corte que também necessitam de análise de tecido também serão contemplados com o uso em rotina desse novo processo de digestão de amostras vegetais. Em curto espaço de tempo, devido a economia de energia, reagentes, tempo e sobretudo no novo patamar de segurança para os analistas e laboratoristas, o equipamento terá seu custo amortizado.

Equipamento 2. O servidor Sun X4470 e dois microcomputadores e dois nobreaks serão utilizados para a realização das análises bioinformáticas, incluindo (i) extração de sequências a partir dos dados brutos do sequenciador; (ii) montagem do transcriptoma; (iii) anotação de sequências contra bancos de dados públicos; (iv) transcriptômica comparativa entre fases e tecidos; (v) transcriptômica comparativa contra genomas e transcriptomas de outras plantas já sequenciadas; (vi) descoberta de genes diferencialmente expressos em condições testadas e (vii) análises estatísticas dos dados obtidos.

Equipamento 3. Nas mesas de hidroponia serão selecionados, em solução nutritiva, os materiais tolerantes ao alumínio.

Equipamento 4. Balança necessária para pesagens dos reagentes para preparo das várias soluções.

Equipamento 5. Máquina para produção de gelo para manter as amostras utilizadas para extração de RNA em baixa temperatura durante o processamento;

Equipamento 6. Equipamento que será utilizado para análise da expressão de genes candidatos relacionados à tolerância ao alumínio (genes já prospectados). Atualmente a Embrapa Gado de Corte possui um único equipamento de PCR em tempo real que atende todos os laboratórios de biotecnologia relacionados às áreas de sanidade animal, melhoramento animal e genômica vegetal. Um segundo equipamento aumentaria a capacidade de realização das análises necessárias para um bom desenvolvimento da pesquisa na área de genômica vegetal de forrageiras nativas e exóticas na Embrapa Gado de Corte.

j) cronograma físico-financeiro

EXPERIMENTOS EM LABORATÓRIO, CASA DE VEGETAÇÃO E CÂMARA DE CRESCIMENTO (FITOTRON) – Experimentos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

Atividade	2011				2012				2013			
	TRIMESTRES											
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Avaliação de genótipos quanto à tolerância ao alumínio	X											
Avaliação de genótipos quanto à tolerância ao alagamento		X										
Avaliação da tolerância à seca			X									
Germinação das sementes dos genótipos resistente e susceptível				X								
Submissão das plantas aos tratamentos: sob estresses e não-estresse			X	X	X							
Extração de RNA e obtenção do cDNA de folhas e/ou raízes			X	X	X							
Sequenciamento						X	X					
Análise das sequencias - bioinformática								X	X	X	X	
ESTs depositadas em bancos de dados												X
Publicação dos resultados												X
Relatório final e prestação de contas												X

EXPERIMENTO EM CAMPO E EM CASA DE VEGETAÇÃO – EXPERIMENTO 2

Ano/semestre	2011		2012		2013	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Ações						
Planejamento	X		X		X	
Implantação		X		X		X
Acompanhamento experimental	X	X	X	X	X	X
Confecção de material para divulgação					X	X
Relatórios*			X		X	X
Material de publicação					X	X

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

Embrapa Gado de Corte

A Embrapa Gado de Corte conta com o quadro de funcionários que possui diversos pesquisadores e técnicos especialistas competentes, além de alunos de graduação, mestrado e doutorado que estarão envolvidos na pesquisa a ser desenvolvida. Esta unidade conta atualmente com dois laboratórios que desenvolvem pesquisas em biotecnologia vegetal, além daqueles que desenvolvem pesquisas na área animal, estes laboratórios contam com máquinas de PCR, centrifugas refrigeradas e microcentrifugas, banhos-maria (sendo um refrigerado), sequenciador de DNA, máquina de PCR em tempo real, aparelho de focalização isoeletrica, câmaras de fluxo laminar, cubas para eletroforese vertical e horizontal, fontes de alta voltagem para eletroforese (5000 V e 300 V), equipamento para purificação de água tipo MilliQ, além de outros equipamentos menores que estarão disponíveis para a realização deste trabalho. Este Centro da Embrapa vem despontando como um pólo de biotecnologia no Estado de Mato Grosso do Sul, entretanto, a área de genômica vegetal carece de alguns equipamentos aqui solicitados.

Além da infraestrutura de biotecnologia, a Embrapa Gado de Corte possui, disponível para os experimentos duas casas de vegetação e uma câmara de crescimento (fitotron).

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Esta unidade da Embrapa conta com pesquisadores, analistas e assistentes que desenvolvem na sua maioria trabalhos em biotecnologia e possui toda infra-estrutura necessária para a realização de trabalhos na área. Na atividade a ser realizada nesta instituição não serão necessários novos equipamentos, apenas material de consumo.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Cerrados

Estas duas unidades da Embrapa contam com pesquisadores, analistas e assistentes que desenvolvem na sua maioria trabalhos em biotecnologia e possui toda infra-estrutura necessária para a realização de trabalhos na área. Na atividade a ser realizada nesta instituição não serão necessários novos equipamentos, apenas material de consumo.

Universidade Católica de Brasília, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e Universidade Estadual de Campinas

Possuem pesquisadores bem qualificados na área de bioinformática e biologia molecular com a infra-estrutura mínima necessária para desenvolver pesquisas nas atividades propostas no projeto, como servidor SUN FIRE, computadores, softwares e laboratórios.

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

Integrante	Função	Atividades	Dedi- cação horas/Mês
Valdemir Antônio Laura 095.443.798-51	Coordenador e Pesquisador	Coordenação do projeto; Fenotipagem para os diferentes estresses dos genótipos de gramíneas e leguminosas forrageiras; germinação de plantas tolerantes e sensíveis e tratamento dessas sob estresses para extração de RNA.	100
Lucimara Chiari 174.020.388-74	Vice- Coordena- dora e Pesquisadora	Vice-coordenação do projeto; Avaliação da expressão de genes, prospectados em <i>B. decumbens</i> , potencialmente relacionados à tolerância ao Al por qRT-PCR; Extração de RNA e obtenção do cDNA de folhas e/ou raízes e envio das amostras para sequenciamento; descoberta de genes diferencialmente expressos em condições testadas e análises estatísticas dos dados obtidos.	100
Cacilda Borges do Valle 754.853.708-53	Pesquisadora	Responsável pelo estabelecimento e manutenção da coleção e produção de híbridos do gênero <i>Brachiaria</i> na Embrapa Gado de Corte.	40
Diva Maria de Alencar Dusi 520.896.736-72	Pesquisadora	Localização da expressão de genes potencialmente relacionados à tolerância ao alumínio, já identificados em ápices radiculares de <i>B. decumbens</i> .	40
Francisco Prosdocimi de Castro Santos 039.168.136-25	Pesquisador	Análises bioinformáticas: extração de sequências a partir dos dados brutos do sequenciador; montagem do transcriptoma; anotação de sequências contra bancos de dados públicos; transcriptômica comparativa entre fases e tecidos; transcriptômica comparativa contra genomas e transcriptomas de outras plantas já sequenciadas; descoberta de genes diferencialmente expressos em condições testadas e análises estatísticas dos dados.	60
Karem Guimarães Xavier Meireles 992.555.886-72	Pesquisadora	Auxílio para descoberta de genes diferencialmente expressos em condições testadas e análises estatísticas dos dados.	30
Letícia Jungmann Cançado 809.882.961-87	Pesquisadora	Construção de um mapa genético visando à identificação regiões do genoma de <i>Brachiaria decumbens</i> associadas à tolerância ao Al por meio de mapeamento de QTLs.	80
Liana Jank 031.120.498-88	Pesquisadora	Responsável pelo estabelecimento e manutenção da coleção e produção de híbridos da espécie <i>Panicum maximum</i> na Embrapa Gado de Corte.	40
Manuel Claudio Motta Macedo 618.722.298-91	Pesquisador	Responsável pela validação em campo da fenotipagem para tolerância ao alumínio e à eficiência de uso aos nutrientes: Ca, Mg e P.	60

Rosangela Maria Simeão 631.410.786-53	Pesquisadora	Responsável pelo estabelecimento e manutenção da coleção de <i>Stylosanthes</i> e <i>Arachis</i> e produção de híbridos das espécies de <i>Stylosanthes</i> na Embrapa Gado de Corte e responsável pela geração das populações segregantes	40
Said Sadique Adi 786.306.571-20	Pesquisador	Análises bioinformáticas: anotação de sequências contra bancos de dados públicos; descoberta de genes diferencialmente expressos em condições testadas e análises estatísticas dos dados.	40
Allan Kardec Braga Ramos 427.117.463-72	Colaborador	Fenotipagem para tolerância ao déficit hídrico.	20
Anete Pereira de Souza 067.606.548-11	Colaboradora	Análises de SSR e mapeamento de QTLs de tolerância ao Al.	20
Cláudio Takao Karia 104.136.878-05	Colaborador	Melhoramento e nas análises com marcadores moleculares em espécies de <i>Stylosanthes</i>	20
Marcelo Ayres Carvalho 329.980.581-91	Colaborador	Melhoramentos de leguminosas forrageiras nativas.	20
Gisele Olivas Leguizamón 422.024.341-00	Assistente (laboratorista)	Auxílio nas extrações de RNA e obtenção de cDNA.	30
Renato Henrique Marçal de Oliveira 028.353.059-63	Assistente (laboratorista)	Auxílio no preparo das amostras para sequenciamento.	30

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

O grupo de pesquisadores participantes da presente proposta já tem atuado em conjunto em alguns projetos (em andamento e/ou concluídos) relacionados ao tema proposto: “Viabilização de cruzamentos intraespecíficos no gênero *Brachiaria*”, com recebimento de apoio financeiro da FUNDECT/MS - Chamada Fundect/CNPq nº 01/2004 - DCR-II; “Avaliação agrônômica e seleção de acessos da leguminosa forrageira *Stylosanthes guianensis* em Mato Grosso do Sul”, com recebimento de apoio financeiro da FUNDECT/MS - Chamada Fundect Nº 01/2004 - UNIVERSAL; “Prospecção de Genes de Tolerância ao Alumínio em Gramíneas Forrageiras do Gênero *Brachiaria*”, com recebimento de apoio financeiro da FUNDECT/MS - Chamada Fundect Nº 04/2006 - UNIVERSAL; “Avaliação e seleção de materiais genéticos das leguminosas forrageiras *Stylosanthes guianensis* e *Arachis spp*”, com recebimento de apoio financeiro da FUNDECT/MS - Chamada Fundect Nº 04/2006 - UNIVERSAL; “Avaliação e seleção de híbridos de *Brachiaria* quanto à tolerância aos estresses hídricos”, com recebimento de apoio financeiro da FUNDECT/MS - Chamada FUNDECT Nº 05/2008 – POSGRAD - Mestrado; “Expressão diferencial de proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência a cigarrinha-da-pastagem em *Brachiaria brizantha*”, com recebimento de apoio financeiro da FUNDECT/MS - Chamada FUNDECT Nº 15/2009 – POSGRAD – Mestrado.

Além dos pesquisadores e colaboradores, alunos de pós-graduação (mestrado e doutorado) e iniciação científica participarão e/ou serão incorporados às atividades propostas no presente projeto.

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

Para este projeto não há estimativas de recursos financeiros adicionais de outras fontes, todavia, há a disponibilidade dos recursos aprovados dos projetos em desenvolvimento com apoio da FUNDECT/MS, CNPq e da Embrapa (conforme item m) e de infra-estrutura de laboratórios, casa de vegetação, câmara de crescimento e áreas agrícolas da fazenda da Embrapa Gado de Corte, para a condução dos experimentos. Além da infraestrutura disponível, há mão-de-obra altamente qualificada disponível e, recursos serão aportados na forma de salários.

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 grande interesse das instituições parceiras na execução do presente projeto. A aprovação deste é de suma importância, pois assim se intensificará as parcerias, ainda incipientes, das instituições de pesquisa e Universidades do Centro-Oeste e haverá a aquisição de equipamentos fundamentais para aprofundar pesquisas nas áreas propostas.

p) outras considerações

Este projeto possui atividades complementares às atividades em execução no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), com recursos aportados pela Embrapa via CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research), na ordem de R\$ 150.000,00/ano, por dois anos (2011 e 2012). Estes recursos estarão disponíveis também para capacitação e consultorias recíprocas entre as duas Instituições.

q) referências bibliográficas

ABIEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br>> Acesso 16 ago 2010.

ALENCAR, C.A.B. **Produção de seis gramíneas tropicais submetidas a diferentes lâminas de água e adubação nitrogenada.** (Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa). Imprensa Universitária, 2007. 151p.

ALVIM, F.C.; CAROLINO, S.M.B.; CASCARDO, J.C.M.; NUNES, C.C.; MARTINEZ, C.A.; OTONI, W.C.; FONTES, E.P.B. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiology**, v.126, p.1042–1054. 2001.

ANIOL, A. Genetics of tolerance to aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell). **Plant and Soil**, v.123, n.2, p.223-227, 1990.

ANIOL, A.; GUSTAFSON, J.P. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye and triticale. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.26, p.701-705, 1984.

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

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Virginia, 1995. 2v. Edited by Patricia Cunniff. v.1 (reg. 087/1996) -

Agricultural chemicals; Contaminants; Drugs. v.2 (reg. 088/1996) - Food composition; Additives; Natural contaminants.

ARCHAMBAULT, D.J.; ZHANG, G.; TAYLOR, G.J. Accumulation of Al in root mucilage of an Al-resistant and an Al-sensitive cultivar of wheat. **Plant Physiology**, v.112, n.4, p.1471-1478, 1996.

ARMSTRONG, W.; BRÄNDLE, R.; JACKSON, M.B. Mechanisms of flood tolerance in plants. **Acta Botanica Neerlandica**, v.43, p.307-358, 1994.

ARTECA, R.N. **Plant growth substances: principles and applications**. Chapman and Hall, New York. 1996. p.241-273.

AUSTIN, D.F.; LEE, M. Detection of QTL for grain yield and yield components in maize across generations in stress and nonstress environment. **Crop Science**, v.38, p.1296-1308, 1998.

BARKER, D.J.; SULLIVAN, C.Y.; MOSER, L.E. Water deficit effects on osmotic potential, cell wall elasticity, and proline in five forage grasses. **Crop Science**, v.85, n.2, p.270-275. 1993.

BARUCH, Z. Responses to drought and flooding in tropical forages grasses. I. Biomass allocation, leaf growth and mineral nutrients. **Plant and Soil**, v.164, p.87-96, 1994.

BASTEN, C.J.; WEIR, B.S.; ZENG, Z.-B. Zmap-a QTL cartographer. In: Smith, C.; Gavora, J.S.; Benkel, B.; Chesnais, J.; Fairfull, W.; Gibson, J.P.; Kennedy, B.W.; Burnside, E.B. (eds) *Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: Computing Strategies and Software*, v.22, p.65-66. Published by the Organizing Committee, 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph, Ontario, Canada, 1994.

BASU, U.; McDONALD, J.L.; ARCHAMBAULT, D.J.; GOOD, A.G.; BRIGGS, K.G.; AUNG, T.; TAYLOR, G.J. Genetic and physiological analysis of double-haploid, aluminum, resistant lines of wheat provide evidence for the involvement of a 23 kD, root exudates polypeptide in mediating resistance. **Plant and Soil**, v.196, n.2, p.283-288, 1997.

BIERHALS, J.D.; FERRAZ, J.V. **O pasto perde espaço para a lavoura**. In: ANUALPEC. Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: IFNP, 2008. 380p.

BITENCOURT, G.A.; CHIARI, L.; LAURA, V.A.; VALLE, C.B.; MORO, J.R. Tolerance of genotypes of brachiaria grass to the aluminum. **Revista Brasileira de Zootecnia**, no prelo.

BRAENDLE, R.; CRAWFORD, R.M.M. Plants as amphibians. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, v.2/1, p.56-78, 1999.

BRAY, E.A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**. v.55, p.2331-2341, 2004.

CAETANO, L.P.S.; DIAS FILHO, M.B. [Responses of six *Brachiaria* spp. accessions to root zone flooding](#). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.5, p.795-801, 2008.

CAMARGO, C.E.O.; OLIVEIRA, O.F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, v.40, n.1, p.21-23, 1981.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p.735-744, 2010.

CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, v.42, n.234, p.1-16, 1991.

CIAT. 2007. Tropical Grasses and Legumes: Optimizing genetic diversity for multipurpose use. Cali. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf/report_2006/output_3_part_1.pdf>. Acesso 16 ago 2010.

CIAT. **Evaluación de pasturas con animales: alternativas metodológicas**. Cali, 1986. 292p.

COCHRANE, T.T. Avaliação dos ecossistemas de savana utilizados na América Tropical para produção de gado de corte. In: TERGAS, L.E.; SANCHEZ, P.A.; SERRÃO, E.A.S. (Ed.). **Produção de pastagens em solos ácidos dos trópicos**. Brasília: CIAT/EMBRAPA, 1982. p.17-28.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DE SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS (CFSEMG). Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais; 5ª aproximação. Lavras: CFSEMG, 1999. 359p.

COSTA, M.N.X. **Desempenho de duas gramíneas forrageiras tropicais tolerantes ao estresse hídrico por alagamento em dois solos glei húmicos**. Tese (Doutorado), 89f. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, SP. 2004.

CRESTE, S., TULMANN-NETO, A.; FILQUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.

DEGENHARDT, J.; LARSEN, P.B.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L.V. Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant *Alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology**, v.117, n.1, p.19-27, 1998.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology**, v.103, n.3, p.695-702, 1993.

DIAS-FILHO, M.B.; CARVALHO, C.J. de. Physiological and morphological responses of *Brachiaria* spp. to flooding. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1959-1966, 2000.

DIAS-FILHO, M.B. Opções forrageiras para áreas sujeitas à inundação ou alagamento temporário. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 22., 2005, Piracicaba. Teoria e prática da produção animal em pastagens: **anais...** Piracicaba: Fealq, 2005. p.71-93.

DOERGE, R.W., CHURCHILL, G.A. Permutation test for multiple loci affecting quantitative character. **Genetics**, v.142, p.285-294, 1996.

DOSS, B.D.; ASHLEY, D.A; BENNETT, O.L. Effect of soil moisture regime on root distribution of warm season forage species. **Agronomy Journal**, v.52, n.10, p.569-572, 1960.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11–15, 1987.

DUSI, D.M.A. **Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf**. (PhD thesis). University of Wageningen, Wageningen, 2001. 167p.

EMBRAPA. 2007. SIDE - Sistema de informação de apoio à decisão estratégica. Brasília. Disponível em: <<http://intranet.sede.embrapa.br>> Acesso 10 julho 2008.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa-SPI; Rio de Janeiro: Embrapa-CNPS, 1999. 412p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Embrapa, 1997. 212p.

EUCLIDES, V.P.B.; EUCLIDES FILHO, K. Avaliação de forrageiras sob pastejo. In: SIMPOSIO SOBRE AVALIAÇÃO DE PASTAGENS COM ANIMAIS, 1997, Maringá. **Anais...** Maringá: Cooper Graf, 1997. p.85-111.

FAHEY Jr., G.C. **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1994. 998p.

FOY, C.D. Differential aluminum and manganese tolerances of plant species and varieties in acid soils. **Ciência e Cultura**, v.28, n.2, p.150-155, 1976.

FOY, C.D. Effects of aluminium on plant growth. In: WCARSON, E. (Ed.). **The Plant Root and Its Environment**. University Press of Virginia, Charlottesville, VA, 1974. p.601–642.

FOY, C.D. Soil Chemical Factors Limiting Plant Root Growth. In: HATFIELD, J.L., STEWART, B.A. (Ed.). **Advances in soil science: limitation to plant root growth**. Springer-Verlag, New York, 1992. p.97-149.

- FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act?. **Trends in Plant Science**, v.9, p.449-456, 2004.
- FURLAN, L. R.; FERRAZ, A. L. J.; BORTOLOSSI, J. C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.331-341, 2007.
- GALLEGO, F.J., BENITO, C. Genetic control of aluminium tolerance in rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, n.3, p.393-399, 1997.
- GARVIN, D.F.; CARVER, B.F. The role of the genotype in tolerance to acidity and aluminum toxicity. In: RENGEL, Z. (Ed.). **Handbook of Soil Acidity**. New York, 2003. p.387-406.
- GREENBAUM, D.; LUSCOMB, N.M.; JANSEN, R. et al. Interrelating different types of Genomic data, from proteome to secretome: 'Oming in on function. **Genome Research**, v.11, p. 1463-1468, 2001.
- GUIMARÃES Jr., R.; CABRAL FILHO, S.L.S.; FERNANDES, F.D.; VILELA, L.; MARTHA JÚNIOR, G.B. Relação entre pressão e volume para implantação da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases na Embrapa Cerrados. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 144).
- HODGSON, J. **Grazing management: science into practice**. Hong Kong: Longman, 1990. 203p.
- HUTTOVÁ, J.; TAMÁS, L.; MISTRÍK, I. Aluminium induced acid phosphatase activity in roots of Al-sensitive and Al-tolerant barley varieties. **Rostlinná Výroba**, v.48, n.12, p.556-559, 2002.
- INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.47, p.377-403, 1996.
- IPCC. 2007. Intergovernmental Panel on Climatic Change – 4th Assessment Report. <http://www.ipcc.ch/>.
- JANSEN, R.C.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, v.136, p.1447-1455, 1994.
- JONES, D.L., KOCHIAN, L.V. Aluminum inhibition of the 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? **Plant Cell**, v.7, n.2, p.1913-1922, 1995.
- KAISER, W.M. Effect of water deficit on photosynthetic capacity. **Physiologia Plantarum**, v.71, n.1, p.142-49, 1987.
- KANNO, T.; MACEDO, M.C.M.; EUCLIDES, V.B.P.; BONO, J.A.M.; SANTOS JÚNIOR, J.D.G.; CORRÊA, R.M.; BERETTA, L.G. Root biomass of five tropical grass pastures under continuous grazing in Brazilian Savannas. **Grassland Science**, v.45, n.1, p.9-14. 1999.
- KANO, T.; UOZUMI, S.; MACEDO, M.C.M. et al. Avaliação de quatro espécies de *Brachiaria* submetidas ao estresse hídrico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., Porto Alegre, 1999. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. p.79.
- KAO, C.H.; ZENG, Z.B.; TEASDALE, R. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, v.152, p.1203-1216, 1999.
- KASUGA, M., LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, v.17, n.3, p.287-291, 1999.
- KLAR, A.E.; USBRTI J.R.; A., HENDERSON, D.W. Diferencial responses of guinea grass populations to drought stress. **Crop Science**, v.18, n.5, p.853-857, 1978.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.237-260, 1995.

- KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.459-493, 2004.
- KOSAMBI D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annual Eugenics**, v.12, p.172-175, 1944.
- KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology**, Victoria, v.1, 1997. Disponível em: <http://www.heronpublishing.com/tp/monograph/kozlowski.pdf>. Acesso em: 13 out. 2005.
- KUMAR, L.S. DNA markers in plant improvement. **Biotech Advances**, v.17, p.143-182, 1999.
- LAGOS, M.B., FERNANDES, M.I.M., CAMARGO, C.E.O., FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F. Genetics and monosomic analysis of aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.14, n.4, p.1011-1020, 1991.
- LANDER, E.S., BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.121, p.185-199, 1989.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: Rima, 2000, 531p.
- LAWLOR D.W., CORNIC G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.275-294. 2002.
- LEITE, G.G.; COSTA, N.L.; GOMES, A.C. Efeito do diferimento sobre produção e qualidade da forragem de genótipos de *Brachiaria* spp. em Cerrado do Distrito Federal. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 33.. **Anais...** Fortaleza, p.221-223. 1996.
- LIAO, C.T.; LIN, C.-H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Proceedings of the National Science Council, Roc (B)**, v.25, p.148-157, 2001.
- LIMA, M.; MIRANDA-FILHO, J.B.; FURLANI, P.R. Diallel cross among inbred lines of maize differing in aluminum tolerance. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.18, n.4, p.579-584, 1995.
- LUCHESE, E.B.; FAVERO, L.O.B.; LENZI, E. **Fundamentos da química do solo**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2001. 182p.
- MA, J. F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant and Cell Physiology**, v.41, p.383-90, 2000.
- MACEDO, M.C.M. **Adubação fosfatada em pastagens cultivadas com ênfase na região dos Cerrados**. In: Fósforo na Agricultura Brasileira. **Piracicaba: POTAFOS, 2004. p.359-400**.
- MACEDO, M.C.M. Pastagens no ecossistema cerrado: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentáveis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...**: Goiânia: SBZ, 2005. p.56-84.
- MAGALHÃES, J.V.; GARVIN, D.F.; WANG, Y., SORRELLS, M.E., KLEIN, P.E., SCHAFFERT, R.E., LI, L., KOCHIAN, L.V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics**, v.167, n.4, p.1905-1914, 2004.
- MAGALHÃES, J.V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C.T.; LANA, U.G.P.; ALVES, V.M.C.; WANG, Y.; SCHAFFERT, R.E.; HOEKENGA, O.A.; PINEROS, M.A.; SHAFF, J.E.; KLEIN, P.E.; CARNEIRO, N.P.; COELHO, C.M.; TRICK, H.N.; KOCHIAN, L.V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, v.39, n.9, p.1156-1161, 2007.
- MAGNAVACA, R., GARDNER, C.O.; CLARK, R.B. Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: GABELMAN, H.W.; LOUGHMAN, B.C. (Ed.). **Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition**. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht/Boston/Lancaster, 1987. p.201-212.

MAO, C.; YI, K.; YANG, L.; ZHENG, B.; WU, Y.; LIU, F.; WU, P. Identification of aluminum-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminum-regulated genes for the metabolism of cell wall components. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.394, p.137-143, 2004.

MARIN, A. **Influência associada do estresse hídrico e do alumínio na germinação e crescimento inicial do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.)**. 2003. 87p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. Título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração Produção Vegetal.

MARIN, A.; SANTOS, D.M.M. dos; BANZATTO, D.A.; CODOGNOTTO, L.M. Influência da disponibilidade hídrica e da acidez do solo no teor de prolina livre de guandu. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, n.2, p.355-358, 2006.

MARTEN, G.C.; SHENK, J.S.; BARTON II, F.E., ed. **Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): analysis of forage quality**. [S.l.]:USDA-ARS, 1989. 110p. (USDA-ARS. Agriculture Handbook, 643).

MARTIN, R.B. Aluminum speciation in biology. In: CHADWICK, D.J.; WHELAN, J. (Ed.) **Wiley and sons aluminum in biology and medicine**. New York, 1992. p.5-25.

MIFTAHUDIN, G., SCOLES, G. J.; GUSTAFSON, J. P. AFLP markers tightly linked to the aluminum-tolerance gene *Alt3* in rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, n.4, p.626-631, 2002.

MINELLA, E., SORRELLS, M.E. Inheritance and chromosome location of *Alp*, a gene controlling aluminum tolerance in "Dayton" barley. **Plant Breeding**, v.116, p.465-469, 1997.

NEUMANN, P.M. The role of wall adjustment in plant resistance to water deficits. **Crop Science**, v.35, n.5, p.1258-1266, 1995.

NG, T.T.; WILSON, J.R.; LUDLOW, M.M. Influence of water stress on water relations and growth of a tropical (C_4) grass, *Panicum maximum* var. trichoglume. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.2, n.4, p.581-595, 1975.

NINAMANGO-CÁRDENAS, F.E.; GUIMARÃES, C.T.; MARTINS, P.R.; PARENTONI, S.N.; CARNEIRO, N.P. Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. **Euphytica**, v.130, n.2, p.223-232, 2003.

OHYANAGI, H.; TANAKA, T.; SAKAI, H.; SHIGEMOTO, Y.; YAMAGUCHI, K.; HABARA, T.; FUJII, Y.; ANTONIO, B.A.; NAGAMURA, Y.; IMANISHI, T.; IKEO, K.; ITOH, T.; GOJOBORI, T.; SASAKI, T. The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. *japonica* genome information. **Nucleic Acids Research**, v.34, Database Issue, p.D741-D744, 2006.

OLIVEIRA, A.C. de; USBERTI FILHO, J.A.; SIQUEIRA, W.J. Nova metodologia de avaliação da reação de genótipos de capim-colonião ao alumínio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.35, n.11, p.2261-2268, 2000.

PASSOS, L.P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 223p.

PASSOS, L.P.; VIDIGAL, M.C.; CRUZ, L.O.; VALLE, C.B. do; PERRY, I.G.; NASCIMENTO, I.S. Técnica de cultivo miniaturizado de "*Brachiaria*" visando avaliar os efeitos da toxidez por alumínio. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 41. 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004. CD-ROM.

PASSOS, L.P.; VIDIGAL, M.C.; SOUSA, F.B.; BARUD, H.S.; PAIVA, A.F.C.; VERNEQUE, R.S.; FREITAS, V.P. Autoclave-assisted acidic extraction of water soluble carbohydrates in forage grasses. **Commun. Soil Science Plant Analysis**, v.37, p.1731-1746, 2006.

PELLET, D.M.; PAPERNIK, L.A.; KOCHIAN, L.V. Multiple aluminum-resistance mechanism in wheat. **Plant Physiology**, v.112, n.2, p.591-597, 1996.

PINTO, L.R.; OLIVEIRA, K.M.; ULIAN, E.C.; GARCIA A.A.F.; SOUZA, A.P. Survey in the Sugarcane Expressed Sequence Tag database (SUCEST) for Simple Sequence Repeats. **Genome**, v.47, p.795-804, 2004.

PLATZECK, C.O. **Efeito do estresse hídrico sobre o estabelecimento de *Brachiaria humidicola* e *Setaria anceps* cv. Kazungula**. Dissertação (Mestrado). 97f. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, SP. 1989.

RAO, I.; WENZL, P.; ARANGO, A.; MILES, J.; WATANABE, T.; SHINANO, T.; OSAKI, M.; WAGATSUMA, T.; MANRIQUE, G.; BEEBE, S.; TOHME, J.; ISHITANI, M.; RANGEL, A.; HORST, W. Advances in developing screening methods and improving aluminum resistance in common bean and *Brachiaria*. In: WORKSHOP ON ADVANCES IN IMPROVING ACID SOIL ADAPTATION OF TROPICAL CROPS AND FORAGES AND MANAGEMENT OF ACID SOILS. Brasília, DF, p.7-10, 2005.

REID, D.A. Genetic control of reaction to aluminum in winter barley. In: NILAN, R.A. (Ed.). Barley genetics II. **Proceeding...** 2nd Int. Barley Genetics Symposium, Pullman, WA. USA: Washington State University, 1969. p.409-413.

RESENDE, M.D.V. de. **Software SELEGEN – REML/BLUP**. Colombo: Embrapa Florestas, 65p. 2002. (Embrapa Florestas. Documentos, 77).

RIEDE, C.R.; ANDERSON, J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. **Crop Science**, v.36, p.905-909, 1996.

ROCHE 454 SEQUENCING. System features for GS FLX Titanium series. (November 24, 2008). Disponível em: <<http://www.454.com/products-solutions/system-features.asp>>. Acesso em: 5 jun. 2009.

RONAGHI, M. et al. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, v.281, p.363–365, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/281/5375/363>>. Acesso em: 5 jun. 2009. doi: 10.1126/science.281.5375.363.

ROSENTHAL, W.D.; ARKIN, G.F.; SHOUSE, P.J. et al. Water deficit effects on transpiration and leaf growth. **Agronomy Journal**, v.79, n.6, p.1019-1026, 1987.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.527-60, 2001.

RYAN, P.R.; DITOMASO, J.M.; KOCHIAN, L.V. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, v.44, n.2, p.437-46, 1993.

SAMBROOK, J.E.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

SAS. Institute 1996. SAS/STAT Software: Changes and Enhancements throughout Release. 6.11. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S.J.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **Plant Journal**, v.37, p.645-653, 2004.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A.A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v.30, p.507-512, 1974.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water stress response. **Plant Physiology**, v.115, p.327-334, 1997.

SIBOV, S.T.; GASPAR, M.; SILVA, M.J.; OTTOBONI, L.M.M.; ARRUDA, P.; SOUZA, A.P. Two genes control aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analysis. **Genome**, v.42, n.3, p.475-482, 1999.

SILVA, A.S.; LAURA, V.A.; JANK, L. Soil flood tolerance of seven genotypes of *Panicum maximum* Jacq. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52 n.6, p.1341-1348, 2009.

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: 43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, João Pessoa. **Anais...** Sociedade Brasileira de Zootecnia. 2006. 1 CD-ROM.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.

SIMON, L.; SMALLEY, T.J.; JONES, J.B.; LASSEIGNE, F.T. Aluminum toxicity in tomato. Part 1. Growth and mineral nutrition. **Journal Plant Nutrition**, v.17, p.293-306, 1994.

SMITH, T.P.L.; GROSSE, W.M.; FREKING, B.A. et al. Sequence evaluation of four pooled-tissue normalized bovine cDNA libraries and construction of a gene index for cattle. **Genome Research**, v.11, p.626-630, 2001.

SOUSA, C.A.F. de; SODEK, L. Respostas metabólicas de plantas à deficiência de oxigênio. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, p.83-94, 2002.

STOLEN, O., ANDERSEN, S. Inheritance of tolerance to low soil pH in barley. **Hereditas**, v.88, n.2, p.101-105, 1978.

TANG, Y.; SORRELLS, M.E.; KOCHIAN, L.V.; GARVIN, D.G. Identification of RFLP markers linked to the barley aluminum tolerance gene *Alp*. **Crop Science**, v.40, n.3, p.778-782, 2000.

THOMAS, H. Effect of rate of dehydration on leaf water status and osmotic adjustment in *Dactylis glomerata* L., *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* Lam. **Annals of Botany**, v.57, n.2, p.225-235, 1986.

TURNER, N.C.; JONES, M.M. **Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation**. In: TURNER, N.C.; KRAMER, P.J. Adaptation of plant to water and high temperature stress. New York: J. Wiley, 1980. p.87-104.

VALLE, C.B. do; EUCLIDES, V.P.B.; PEREIRA, J.M.; VALÉRIO, J.R.; PAGLIARINI, M.S.; MACEDO, M.C.M.; LEITE, G.G.; LOURENÇO, A.J.; FERNANDES, C.D.; DIAS-FILHO, M.B.; LEMPP, B.; POTT, A. SOUZA, M.A. de. O capim-xaraés (*Brachiaria brizantha* cv. Xaraés) na diversificação das pastagens de braquiárias. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2004. 36p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 149).

VALLE, C.B.; EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; VALÉRIO, J.R.; CALIXTO, S. Selecting new *Brachiaria* for Brazilian pastures In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., Piracicaba, 2001. **Proceedings...** Piracicaba:FEALQ, 2001. p.536-537.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 475p.

VILELA, L.; SOARES, W.V.; SOUSA, D.M.G. de; MACEDO, M.C.M. Calagem e adubação para pastagens. In: Cerrado: Correção do solo e adubação. Editores: Souza, D.M.G.; Lobato, E. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. 2ª edição. p.367-382.

WENZL, P.; ARANGO, A.; CHAVES, A.L. et al. A greenhouse method to screen *Urochloa* grass genotypes for aluminum resistance and root vigor. **Crop Science**, v.46, n.2, p.968-973, 2006.

WENZL, P.; CHAVES, A.L.; PATIÑO, G.M.; MAYER, J.E.; RAO, I.M. Aluminum stress stimulates the accumulation of organic acids in root apices of *Brachiaria* species. **Journal Plant Nutrition and Soil Science**, v.165, n.5, p.582-588, 2002.

WENZL, P.; PATIÑO, G.M.; CHAVES, A.L.; MAYER, J.E.; RAO, I.M. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. **Plant Physiology**, v.125, n.3, p.1473-1484, 2001.

WU, P.; LIAO, C.D.; HU, B.; YI, K.K.; JIN, W.Z.; NI, J.J.; HE, C. QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, n.8, p.1295-1303, 2000.

ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, p.1457-68, 1994.

ZENG, Z.B.; KAO, C.H.; BASTEN, C.J. Estimating the genetic architecture of quantitative traits. **General Research**, v.74, p.279-289, 1999.

ZHENG, S.J.; YANG, J.L.; HE, Y.F.; YU, X.H.; ZHANG, L.; YOU, J.F.; SHEN, R.F.; MATSUMOTO, H. Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. **Plant Physiology**, v.138, n.1, p.297-303, 2005.

ZHOU, M.X.; LI, H.B.; MENDHAM, N.J. Combining ability of waterlogging tolerance in barley. **Crop Science**, v.47, p.278-284, 2007.