SAMUEL DOS SANTOS STABILE

**Qualidade nutricional e expressão de genes da lignificação
em genótipos de *Panicum maximum* colhidos em três
estágios de maturidade**

Pirassununga

2009

SAMUEL DOS SANTOS STABILE

**Qualidade nutricional e expressão de genes da lignificação
em genótipos de *Panicum maximum* colhidos em três
estágios de maturidade**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Luís Felipe Prada e Silva

Pirassununga

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2118
FMVZ

Stabile, Samuel dos Santos

Qualidade nutricional e expressão de genes da lignificação em genótipos de *Panicum maximum* colhidos em três estágios de maturidade / Samuel dos Santos Stabile. – Pirassununga : S. S. Stabile, 2009.
84 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva.

1. Digestibilidade. 2. Expressão gênica. 3. Gramíneas tropicais. 4. Lignina. 5. Maturidade. I. Título.

PARECER

Interessado: Samuel dos Santos Stabile

Assunto: Protocolo de experimentação.

O Presidente da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto protocolado sob o número 1616/2009, intitulado: "Qualidade nutricional e expressão de genes da lignificação em genótipos de *Panicum maximum* colhidos em três estágios de maturidade", no qual não foi utilizado animal, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética adotados por esta Comissão e aprovou "ad referendum".

São Paulo, 03 de março de 2009

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: STABILE, Samuel dos Santos

Título: Qualidade nutricional e expressão de genes da lignificação em genótipos de *Panicum maximum* colhidos em três estágios de maturidade

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Nutrição e Produção Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Luiz e Gelci, que além de acreditar em mim sempre, jamais mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos, Silas e Fábio, por serem grandes amigos, pela coragem, apoio e força de vontade para estar ao lado.

À minha namorada, amiga e parceira Raquel que se manteve sempre ao meu lado todo este tempo, dando força e apoio nas horas difíceis e sendo parceira em todos os momentos.

E a minha avó materna Maria que deixou tantas saudades no meio desta caminhada, onde não pude despedir-me dela antes de partir... tu ainda és especial Vó Maria.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus! Por sempre acreditar que Ele está ali de olho e orientando toda a nossa caminhada, não importa onde e o momento que for. Obrigado pelas graças alcançadas e vitórias.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal por disponibilizar primeiramente meu estágio e logo após suporte teórico e prático mais que necessário para realizar o mestrado.

Ao Professor e mais do que orientador Dr. Luís Felipe Prada e Silva, primeiramente por acreditar em mim, pela amizade, paciência, lição em todos os sentidos, ética e orientação durante o curso de pós-graduação e pela grande dedicação à pesquisa que tem e empolga os que trabalham com ele.

À Dra. Liana Jank do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte da EMBRAPA em Campo Grande-MS, pela participação no projeto, pela disponibilidade do campo agrostológico da sua unidade da EMBRAPA, pelos ensinamentos, experiência e orientação e a todos os funcionários da unidade que colaboraram nos dias de coleta e duração do experimento.

A todo o corpo docente do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), Prof. Gobesso, Profa. Angélica, Profa. Maria de Fátima, Prof. Paulo Mazza, Prof. Messias, Prof. Gameiro, Prof. Aníbal, Prof. Fagundes, Prof. Romualdo, Prof. Marcos Veiga, Prof. Ricardo e Prof. Francisco Rennó, pela convivência e por sempre estarem disponíveis para ajudar. E também aos professores de outros departamentos e cursos da USP pela convivência e ensinamentos, Prof. Rubens (Rubão), Prof. Ed Hoffmann, Profa. Anneliese Traldi (Kiky), Prof. Visintin, Prof. Titto, Prof. Nogueira e ao amigo pesquisador do INTA – Bariloche (Argentina) Dr. Alejandro Gibbons.

Ao Ari, Gilson, Simi e Isabel, técnicos do Laboratório de Bromatologia (VNP/FMVZ–USP) pela paciência, bom-humor e, principalmente, grande conhecimento técnico, os quais foram fundamentais para realização das análises bromatológicas deste projeto.

Ao Prof. Flávio Meirelles da FZEA e toda sua equipe do laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, Marcos (Marquinhos), Giovana, Lígia, Fabiana (Martini), Paulo, Pedrinho (Feto) e Tiago de Bem, não só pela total disposição em ensinar e ajudar, mas também por momentos de amizade ali cultivada.

À Invitrogen® pelo fornecimento dos *primers* e de todo o material utilizado no laboratório para realização de parte do experimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro ao projeto e a mim pela bolsa concedida.

Ao meu guri (apesar de já ter cabelos brancos), Walter Guimarães Otero, que ajudou sempre que precisei neste projeto, em trabalhos, seminários e em estudos madrugada adentro. Além é claro de se tornar neste período de mestrado um grande e eterno irmão. Valeu Dinho!

À amiga Dra. Carolina Tobias Marino, pela grande ajuda científica, convivência, paciência gigantesca em todos os momentos, auxílio também no projeto, calma total em momentos de stress e amizade sincera.

Ao Dr. Marcos Barbosa Ferreira (Forrest Gump), pelas histórias, ensinamento e amizade. Sem ele esse período de aprendizagem científica seria menos didático. Ao pessoal do CEPTOX, PC, Estér, André, Vânios, Marquinhos, Estevan e Bala, pelos cafezinhos e conversas futebolísticas.

Ao meu amigo, colega e irmão latino Diego Reynaga Salazar, meu grande “parceirão” durante todo o período de mestrado, desde ajudar nas análises no laboratório, churrascos e descontração na hora da cerveja.

Ao amigo eterno e irmão Lucas Domenico Êlmor que foi parceiro para todas as horas, ouvinte e sincero nos momentos difíceis e sempre um braço forte durante o tempo de convivência.

As colegas Marina Vieira de Carvalho e Juliane Diniz Magalhães que foram fundamentais na ajuda das análises do experimento, para o desenvolvimento do mesmo. E pelo mesmo motivo agradeço ao aluno de graduação da FZEA e estagiário Rafael Vasques Sanches pela ajuda durante sua iniciação científica.

Ao pessoal do departamento de transporte e apoio de Pirassununga (STAPIR) pela convivência: Marcão, Limarque, Paula e aos motoristas Reinaldo (Cebolinha) e ao lendário Bigode (esse já patrimônio do Estado de São Paulo).

À Alessandra, Cris, Zequinha e João Paulo, secretários do VNP, pela pronta disposição a todo o momento sem medir esforços.

Aos funcionários da FMVZ e da PCAPS: Everson Lázaro, Gilmar Botteon, Valdir, Maico, Beto, Ismael, Ricardo, Armando, Edílson, Cláudio, Israel, Fernando Schalch, Valmir, José Boteon, Kikão, Belloni, Mauricio Scharlack, Mauricio Pagotti, Nilton, Elso, Vagner (Vagnão), Zanquetin e a todos aos que não recordo, pelos dias de convivência, aprendizado, risadas e piadas.

Aos amigos de Pós-Graduação do VNP, VRA e da FZEA: Carolina Fernanda, Daniel (Emú), Rafael Murarolli, Felipe (GodFather), Carol Bacha, Andrézinho, Silas, Fedozzi, Marina, Vinícius, Fernanda Altieri (Xeila), Willian, Rodrigo Gomes, Rodrigo Ribeiro, Rodrigo Meirelles (Bugio), Arlindo (Minhoca), Raquel Fernandes, André (Pesqueiro), André (Simplão), Simone, Rafael, Andréia, Ariana, Pascoal, Zé Ésler, Milton, Jefferson, Érika, Paula, Daniela, Iaçanã, Henry, Juliana, Julianne, Camila, Cris, Bruna, Waleska, Alessandra, Renata, Artur, Bruno (Presidente), Paulinho Fantinato, Tiago, Octávio Fabián, Lindsay, Otávio, Felipe (Foca), Zé Rodrigo, Flávio (Tenébrio), Fernando Braga (Culhão) e Fernando Pardo, pela alegre convivência que tivemos.

RESUMO

STABILE, S. S. **Qualidade nutricional e expressão de genes da lignificação em genótipos de *Panicum maximum* colhidos em três estágios de maturidade.** [Nutritional quality and expression of lignification genes of *Panicum maximum* genotypes harvested at three stages of maturity]. 2009. **84 f.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

O rápido declínio da qualidade nutricional de *P. maximum* com o avanço da maturidade é um dos maiores limitantes do desempenho animal em pastagens. Devido ao modo de reprodução apomítica da espécie, a engenharia genética surge como importante ferramenta para o desenvolvimento de novas cultivares. Sendo assim, a identificação de genes responsáveis pela queda da digestibilidade da fibra é um passo importante para a geração de cultivares transgênicas. Objetivou-se neste estudo determinar a produtividade, composição bromatológica, digestibilidade *in vitro* das frações folha e colmo de 11 genótipos de *P. maximum* colhidos em três idades de corte: 30, 60 e 90 dias de crescimento, bem como quantificar a expressão de seis enzimas da via de lignificação da parede celular. Objetivou-se ainda a classificação dos genótipos em grupos de acordo com suas características produtivas e de qualidade nutricional. Utilizou-se delineamento de blocos ao acaso, em esquema de parcela subdividida, com três repetições, no qual a parcela experimental foi composta de seis linhas com 4 m de comprimento, espaçadas de 0,5 m, sendo a data de corte a parcela e os genótipos as sub-parcelas. A produção de MS diferiu entre os genótipos somente com 90 dias de crescimento. Houve ainda variação entre os genótipos quando à porcentagem de folhas, colmos e material morto. Os genótipos não diferiram quanto à composição química e digestibilidade da fração folha, porém apresentaram grande variação quanto à composição química e digestibilidade da fração colmo. A fração colmo apresentou maiores valores de FDN, FDA e lignina, e menores valores de PB do que a fração folha. Entretanto, a fração colmo apresentou maior digestibilidade da MS com 60 dias de crescimento e maior digestibilidade da FDN com 30 e 60 dias de crescimento. O agrupamento detectou 4 grupos de genótipos de acordo com produtividade e DIVFDN do colmo. Os acessos PM39 e PM47 se destacaram por boa produtividade, elevada digestibilidade da FDN do colmo, enquanto as cultivares Milênio e Mombaça apresentaram alta produção de

massa, porém baixa digestibilidade da fibra do colmo. A cultivar Massai e os acessos PM39 e PM47 foram selecionados como genótipos com boa manutenção da digestibilidade da fibra (LENTA), enquanto os genótipos Tanzânia, Milênio e Mombaça foram selecionados como genótipos com rápida queda da digestibilidade da fibra do colmo (RÁPIDA) para quantificação da expressão gênica. Foi realizada uma quantificação da expressão relativa de seis genes de interesse (CCR, COMT, C4H, 4CL, CAD e PAL) e um gene controle (GAPDH) nas três idade de corte. Houve interação tratamento × idade para os genes C4H e COMT, com aumento da expressão dos genes de 30 para 60 dias de crescimento somente no grupo de RÁPIDA queda da digestibilidade. No grupo com LENTA queda da digestibilidade não houve alteração da expressão com 60 dias. O gene PAL mostrou comportamento semelhante, porém a interação tratamento × idade não foi significativa. Estas características posicionam estes três genes como possíveis moduladores da digestibilidade do colmo de *P. maximum*. Conclui-se que a maturidade tem maior efeito sobre a qualidade nutricional da fração colmo do que sobre a fração folha e que há grande variação entre os genótipos em relação ao efeito da maturidade sobre a digestibilidade da fração colmo, indicando a possibilidade de seleção de cultivares com maior digestibilidade de colmos, e a dificuldade de se selecionar genótipos com maior digestibilidade de folhas. Identificou-se os genes C4H, COMT e PAL como possíveis candidatos à engenharia genética para produção de cultivares transgênicas.

Palavras-chave: Digestibilidade. Expressão gênica. Gramíneas tropicais. Lignina. Maturidade.

ABSTRACT

STABILE, S. S. **Nutritional quality and expression of lignifications genes of *Panicum maximum* genotypes harvested at three stages of maturity.** [Qualidade nutricional e expressão de genes da lignificação em genótipos de *Panicum maximum* colhidos em três estágios de maturidade]. 2009. **84 f.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

The rapid decline of nutritional quality of *P. maximum* with advanced maturity is an important limiting factor for animal performance in pastures. Because of the apomitic reproduction of the species, genetic engineering arises as an important tool for development of new cultivars. Therefore, the identification of genes responsible for the decline in fiber digestibility is an important step towards generating transgenic cultivars. The objective of this study was to determine the yield, chemical composition, in vitro digestibility of leaf and stem fractions of 11 *P. maximum* genotypes harvested at three stages: 30, 60 and 90 days of regrowth, as well as to quantify the expression of six enzymes from the cell-wall lignification pathway. Another objective was to classify the genotypes in groups according to their productive and nutritional characteristics. A randomized block design in a split plot arrangement with three replications was used, in which the experimental plot was composed of six lines with 4 m length, spaced 0.5 m, being the harvest age the plot and the genotypes the sub-plots. The DM production differed between genotypes only after 90 days of regrowth. There was variation among genotypes in the percentage of leaves, stems and dead material. The genotypes did not differ in chemical composition and digestibility of the leaf fraction, but there was great variation in chemical composition and digestibility of the stem fraction. The stem fraction had higher NDF, ADF and lignin content, and lower CP content than the leaf fraction. However, the stem fraction had higher DM digestibility with 60 days of regrowth, and higher NDF digestibility after 30 and 60 days. The clustering procedure separated the genotypes in four groups according to DM yield, stem NDF digestibility and percentage of leaves. The accessions PM39 and PM47 stood out for their good productivity and high stem NDF digestibility, while the cultivars Milênio and Mombaça had high DM yield but lower stem NDF digestibility. For quantification of gene expression, the Massai cultivar and the accessions PM39 and PM47 were selected

as genotypes with good maintenance of fiber digestibility (SLOW), while the genotypes Tanzânia, Milênio and Mombaça were selected as ones with fast decline in stem fiber digestibility (FAST). The relative expression of six genes of interest (CCR, COMT, C4H, 4CL, CAD and PAL), and one control gene (GAPDH) was determined in the three harvested ages. There was a treatment $\times$ age interaction for the C4H and COMT genes, with an increase in gene expression from 30 to 60 days of regrowth only in the group with FAST decline in digestibility. In the group with SLOW decline in digestibility, there was no difference in expression from 30 to 60 days of regrowth. The gene PAL had similar profile of expression; however the treatment $\times$ age interaction was not significant. These characteristics place these three genes as possible modulators of stem digestibility in *P. maximum*. We conclude that maturity has a great effect over the stem nutritional quality than over leaves, and there was great variation among genotypes in the effect of maturity on stem fiber digestibility, indicating the possibility to select cultivars with higher stem digestibility, and also the difficulty to select genotypes with higher leaf digestibility. We identified the genes C4H, COMT and PAL as possible candidates for genetic engineering aiming the production of transgenic cultivars.

Key words: Digestibility. Gene expression. Tropical grasses. Lignin. Maturity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Foto de géis de agarose 1% das 54 amostras de RNA total.....57
- Figura 2 - Curvas de amplificação dos genes CAD, CCR, COMT, 4CL, PAL e C4H por PCR em tempo real.....60
- Figura 3 - Curvas de dissociação dos genes CAD, CCR, COMT, 4CL, PAL e C4H amplificados por PCR em tempo real.....61
- Figura 4 - Validação do ensaio de PCR quantitativo. Nós testamos as suposições que as eficiências de amplificação dos genes GAPDH, 4CL, C4H, CAD, COMT, CCR e PAL nas reações de PCR são similares e próximas a 2,0 (100%). Quantidades diferentes de conjuntos de amostras de cDNA do colmo de *P. maximum* correspondentes a 0,0015, 0,015 e 0,15 ug de RNA total foram utilizadas para gerar curvas padrões. Insertos nestes gráficos são curvas de unidades de fluorescência relativas plotadas contra número de ciclos de PCR. As eficiências de amplificação definidas como aumento do produto por ciclo foram calculadas como $2^{(-1/\text{slope})}$. Estes dados demonstram que as eficiências de amplificação destes genes foram similares e próximas a 100%.....62
- Figura 5 - Efeito de tratamento sobre a expressão do gene C4H em três idades de corte.....65
- Figura 6 - Efeito de tratamento sobre a expressão do gene 4CL em três idades de corte.....66
- Figura 7 - Efeito de tratamento sobre a expressão do gene CCR em três idades de corte.....67
- Figura 8 - Efeito de tratamento sobre a expressão do gene COMT em três idades de corte.....68
- Figura 9 - Efeito de tratamento sobre a expressão do gene PAL em três idades de corte.....69
- Figura 10 - Efeito de tratamento sobre a expressão do gene CAD em três idades de corte.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Temperatura e precipitação pluviométrica na região de Campo Grande-MS no período de 29/12/2005 a 01/04/2006.....	31
Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR comum.....	38
Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR em tempo real.....	38
Tabela 4 - Programa utilizado na amplificação dos genes.....	39
Tabela 5 - Altura média de 11 genótipos de <i>P. maximum</i> colhidos em três idades de corte.....	48
Tabela 6 - Produção de matéria seca verde e proporção de folhas, colmos e material morto de 11 genótipos de <i>P. maximum</i> colhidos em três idades de corte.....	49
Tabela 7 - Composição bromatológica da fração colmo de 11 genótipos de <i>Panicum maximum</i> colhidos em três idades de corte.....	50
Tabela 8 - Digestibilidade <i>in vitro</i> da fração colmo de 11 genótipos de <i>Panicum maximum</i> colhidos em três idades de corte.....	51
Tabela 9 - Matriz de correlações entre composição química e digestibilidade da MS e FDN da fração colmo e da fração folha de onze genótipos de <i>Panicum maximum</i> colhidos em três idades.....	51
Tabela 10 - Composição bromatológica da fração folha de 11 genótipos de <i>Panicum maximum</i> colhidos em três idades de corte.....	52
Tabela 11 - Digestibilidade <i>in vitro</i> da fração folha de 11 genótipos de <i>Panicum maximum</i> colhidos em três idades de corte.....	53
Tabela 12 - Composição química e digestibilidade <i>in vitro</i> da fração colmo e da fração folha de onze genótipos de <i>Panicum maximum</i> colhidos em três idades.....	54

Tabela 13 - Grupos de genótipos de <i>Panicum maximum</i> e média das variáveis em cada grupo.....	55
Tabela 14 - DIVFDN do colmo de 11 genótipos de <i>P. maximum</i> colhidos em três idades de corte.....	56
Tabela 15 - Análise em espectrofotômetro do RNA total das amostras selecionadas de <i>Panicum maximum</i>	58
Tabela 16 - Ciclo de limiar de detecção do corante SYBR-Green (Ct).....	63
Tabela 17 - Efeito de tratamento (LENTA vs. RÁPIDA) sobre a expressão de genes da via de lignificação medida através do ciclo de limiar de detecção do corante SYBR-Green (Ct).....	63
Tabela 18 - Efeito de tratamento (LENTA vs. RÁPIDA) sobre a expressão de genes da via de lignificação medida através do ΔCT ($Ct_{GAPDH} - \Delta Ct_{gene\ alvo}$). Quanto maior (mais próximo de 0) o número de ΔCT , maior a expressão do gene.....	64
Tabela 19 - Valor de P para efeito de idade de corte dentro de tratamento ou efeito de tratamento dentro de idade de corte.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

MS	Matéria seca
MSV	Matéria seca verde
PMSV	Produção de Matéria seca verde
FDN	Fibra em detergente neutro
FDA	Fibra em detergente ácido
PB	Proteína bruta
ha	Hectáres
P ₂ O ₅	Superfosfato simples
K ₂ O	Cloreto de potássio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
DIVMS	Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca
DIVFDN	Digestibilidade <i>in vitro</i> da fibra detergente neutro
CO ₂	Gás carbônico
RNA	Ácido Ribonucleico
mRNA	RNA Mensageiro
cDNA	DNA Complementar
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EST	Etiquetas de expressão gênica
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
COMT	Cafeoil-CoA O-Metiltransferase
CCR	Cinamoil-CoA Redutase
4CL	4-Coumarato-CoA Ligase
C4H	Cinamato 4-Hidroxilase
CAD	Cinamil Álcool Desidrogenase
PAL	Fenilalanina Amônia Liase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 A planta <i>Panicum maximum</i> e sua produção	23
2.2 Efeito da maturidade sobre a qualidade nutricional do <i>Panicum maximum</i>.....	25
2.3 Caracterização dos genes ligados à lignificação.....	27
3 HIPÓTESE	29
4 OBJETIVOS.....	30
5 MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 Análises bromatológica e de digestibilidade <i>in vitro</i>	32
<i>5.1.1 Análise de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN).....</i>	<i>32</i>
<i>5.1.2 Análise de fibra em detergente ácido (FDA) e lignina .....</i>	<i>33</i>
<i>5.1.3 Análise da digestibilidade in vitro da MS e do FDN .....</i>	<i>34</i>
5.2 Extração do RNA total dos genótipos selecionados.....	35
5.3 Síntese de cDNA dos genótipos selecionados.....	37
5.4 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores	37
5.5 Amplificação de cDNA por PCR.....	39
5.6 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real	39
5.7 Eficiência de amplificação.....	41
5.8 Análise estatística	41
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1 Resultados da bromatologia: produção e digestibilidade.....	43
6.2 Seleção dos genótipos para estudo da expressão gênica.....	56
6.3 Eletroforese em gel de agarose.....	56

6.4 Leitura em espectrofotômetro.....	57
6.5 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real.....	59
6.5.1 <i>Eficiência de amplificação.....</i>	61
6.5.2 <i>Quantificação da expressão das 54 amostras.....</i>	62
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO A.....	83

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Forragens são a base da alimentação de bovinos no Brasil. Aproximadamente 95% da carne bovina produzida no Brasil é oriunda de rebanhos alimentados exclusivamente com forragens (ANUALPEC, 2004). O mesmo acontece em rebanhos leiteiros, onde forrageiras fornecem a maioria dos nutrientes para a produção anual de 20 bilhões de litros de leite (ANUALPEC, 2004). Em termos geográficos, as pastagens ocupam 76% da área agricultável brasileira, o que corresponde a aproximadamente 177 milhões de ha (AGRIANUAL, 2004).

P. maximum é uma das espécies de plantas forrageiras mais importantes para a produção de bovinos nas regiões de climas tropical e subtropical (SOUZA, 1999).

A produção de forragens de capins tropicais, sobretudo do gênero *P. maximum*, tem potencial para grande produtividade, em especial na época das águas (FRANÇA et al., 2007). No entanto, as gramíneas tropicais, à medida que amadurecem, diminuem drasticamente o seu teor protéico e aumentam o seu teor de fibra e de lignina, o que limita o desempenho animal. Em função disso, a queda da qualidade nutricional de forrageiras tropicais com o avanço da maturidade é um dos grandes responsáveis pela baixa produtividade de sistemas de produção de carne e leite.

A parede celular (fibra) corresponde de 50 a 80% da matéria seca (MS) de forragens, e representa a maior fonte de energia para ruminantes. O sistema digestivo dos ruminantes e populações microbianas associadas são adaptados para obterem nutrientes e energia da parede celular de forragens; mas, infelizmente menos de 50% desta fração é digerida e utilizada pelo animal (BUXTON; REDFEARN, 1997). Sendo assim, a qualidade da fibra é o fator mais limitante à produção de ruminantes em regiões tropicais (WATTIAUX; MERTENS; SATTER, 1991).

A limitação mais importante na digestibilidade de paredes celulares é a lignina (CHERNEY et al., 1991; BUXTON; REDFEARN, 1997; VOGEL; JUNG, 2001). A lignificação de tecidos limita a quantidade de energia digestível disponível aos ruminantes, resultando em uma utilização incompleta da celulose e hemicelulose pelos animais (CASLER; BUXTON; VOGEL, 2002; FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004).

Ligninas são heteropolímeros fenólicos complexos associados com os componentes polissacarídicos da parede de células específicas. Além do conteúdo de lignina, a composição da lignina é um fator importante que influencia a digestibilidade de forragens (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996). A lignina em gramíneas é composta por unidades guaiacílicas (G) derivadas do álcool coniferílico, unidades siringílicas (S) derivadas do álcool sinapílico, e unidades p-hidroxifenílicas (H) derivadas do álcool p-coumarílico.

Além do teor e composição da lignina, a ligação dos carboidratos da parede celular com o polímero da lignina tem efeito marcante sobre a digestibilidade da parede celular de gramíneas (GRABBER; HATFIELD; RALPH, 1998). Na parede celular de gramíneas, o ácido ferúlico e moléculas derivadas exercem um papel importante na ligação de polissacarídeos da parede celular com a lignina (GRABBER; RALPH; HATFIELD, 2000). Estudos com digestão enzimática sugerem que o conteúdo de ferulato e digestibilidade da parede celular estão negativamente correlacionados (GRABBER; HATFIELD; RALPH, 1998).

Apesar de não ser conhecido como ocorre o controle da síntese de lignina, evidências experimentais sugerem que a deposição de lignina e sua composição ocorre de maneira distinta em diferentes tecidos da planta e espécies vegetais (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996). Esta diferença específica a cada tecido na lignificação pode ser responsável pela baixa correlação entre concentração de lignina e degradabilidade da parede celular de amostras de forragens com maturidade similar (JUNG; CASLER, 2006). Da mesma forma, diferentes enzimas podem ser responsáveis pelo grau de lignificação de diferentes partes da planta e em diferentes espécies vegetais. Sendo assim, é preciso identificar qual ou quais enzimas controlam o fluxo de biossíntese de lignina durante o desenvolvimento de forrageiras tropicais, de modo a aumentar a compreensão do processo e auxiliar no desenvolvimento de novas técnicas para manipular a qualidade da forragem. Estudos correlacionais de expressão gênica de enzimas e acúmulo de produtos, apesar de não gerarem respostas definitivas, podem auxiliar na detecção dos passos limitantes à síntese de lignina (CAMM, 1973; HU et al., 1998).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A planta *Panicum maximum* e sua produção

A forrageira do presente estudo pertence à ordem *Cyperales*, à família *Poaceae*, gênero *Panicum*, espécie *Panicum maximum* Jacq. A espécie é originária da África e foi acidentalmente introduzida no Brasil no século XVIII com a escravidão. Através dos anos, as muitas espécies e variedades se adaptaram com muita facilidade por aqui e hoje são consideradas nativas em algumas regiões (HERLING et al., 2001).

No Brasil, a produção de bovinos de corte ocorre predominantemente em sistemas a pasto, onde as pastagens tropicais são as principais fontes de alimento para os ruminantes, sendo sensivelmente mais econômica em relação aos concentrados (AGUIAR; VASQUEZ; SILVA, 2000). O *P. maximum* é uma das espécies de plantas forrageiras mais importantes para a produção de bovinos nas regiões de climas tropical e subtropical (SOUZA, 1999), principalmente devido ao potencial para grande produtividade, em especial na época das águas (FRANÇA et al., 2007).

O potencial de utilização deste capim pode ser verificado através dos resultados obtidos durante a avaliação dos acessos no banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte. O cultivar Tanzânia, por exemplo, produziu 33 t/ha/ano de matéria seca total, sendo 26 t/ha/ano de matéria seca foliar (80%). No entanto este potencial nem sempre tem sido convertido em produção animal (SANTOS, 2002). Resultados do programa de melhoramento genético das forrageiras da Embrapa Gado de Corte revelaram que a média de produtividade de massa seca por ha por ano, dos melhores ecotipos de *P. maximum*, foi de 44.000 kg quando adubados e 36.000 kg sem adubação (MELLO, 2002).

Os cultivares de *P. maximum* apresentam uma grande estacionalidade de produção. Cecato et al. (1996) conduzindo um experimento com *P. maximum* cv Tanzânia, realizou cortes a cada 35 dias no verão e 70 dias no inverno, onde a produção por corte no verão foi de 7.441 kg de MS/ha e no inverno caiu para 2.711 kg de MS/ha. Já Barbosa et al. (1996) trabalhando com o cultivar Mombaça, obtiveram uma produção de 7,2 t de MS/ha no verão e 2,4 t de MS/ha no inverno, não sendo

muito diferente a produção dos cultivares entre um experimento e outro nos diferentes períodos do ano.

A estacionalidade climática, principalmente temperatura e precipitação, conduz a diferenças no potencial produtivo destas plantas forrageiras de clima tropical. Durante o período das chuvas, a temperatura, a luz e a umidade não constituem fatores limitantes ao desenvolvimento das plantas forrageiras e dependendo das condições de manejo, pode-se obter elevada taxa de crescimento e produção de matéria seca (HERLING et al., 2001).

O manejo do pasto é planejado visando vários objetivos como proporcionar rebrota vigorosa, obter elevada produção de matéria seca e sincronizar disponibilidade e necessidade de forragem, atingindo elevado nível de aproveitamento da forragem produzida. Isto leva a redução de perdas por senescência, aumenta a eficiência de colheita de forragem de boa qualidade (SANTOS; BALSALOBRE; CORSI, 2004).

O índice de área foliar ótimo de uma planta, ou simplesmente o IAF, tem grande importância no potencial de uma forrageira para chegar ao seu máximo de produtividade sem perder a qualidade nutricional para os animais. Carnevalli (2003) trabalhando com *P. maximum* cv Mombaça, encontrou este ponto de IAF com 95% de interceptação de luz (IAF) quando a forrageira estava com altura média por volta dos 0,91m. Após a obtenção do IAF, há um rápido aumento na altura do colmo da planta, acompanhado do aumento de material senescente. Assim, este mesmo autor afirma que a altura do pasto pode ser usada como um indicador confiável de campo para monitorar e controlar o rebrote e o processo de pastejo.

Barbosa (2004) realizando trabalho semelhante com capim Tanzânia, encontrou este ponto de IAF com altura um pouco menor do capim, por volta dos 0,71m. Submetendo cinco variedades de *P. maximum* a regimes de corte, Moreno (2004) encontrou um grande acúmulo de colmos e material morto durante o rebrote a partir dos 95% de interceptação de luz.

Hack (2004) encontrou uma diferença significativa na produção diária de leite (kg/vaca/dia) em pastos de capim Mombaça pastejados em diferentes alturas pré-pastejo. As médias de produção nos meses de janeiro e fevereiro daquele ano foram de 14,0 e 10,8 kg/vaca/dia para os pastos com 0,90 e 1,40m de altura, respectivamente.

Com isso, podemos exemplificar que para intensificar uma produção animal a pasto, deve ser respeitado um limite de produção das forragens e suas exigências para a manutenção de qualidade da mesma, sendo que este ponto ótimo de colheita deve

ter um ajuste diferente para cada espécie forrageira, conforme for a resposta ao manejo utilizado.

2.2 Efeito da maturidade sobre a qualidade nutricional do *Panicum maximum*

A eficiência da utilização das plantas forrageiras pelos animais está na dependência da qualidade e da quantidade de forragem disponível na pastagem e do potencial do animal (REIS; RODRIGUES, 1993).

O baixo valor nutritivo das forrageiras tropicais é freqüentemente mencionado na literatura (HERLING et al., 2001). Esse valor nutritivo está associado ao reduzido teor de proteína e minerais e ao alto conteúdo de fibras. À medida que a planta amadurece, a produção dos componentes potencialmente digeríveis (carboidratos solúveis, proteínas e minerais) tende a decrescer. Ao mesmo tempo, as frações indigeríveis (lignina, celulose e hemicelulose protegidas, cutícula e sílica) aumentam. Conseqüentemente, decréscimos na digestibilidade são esperados (EUCLIDES, 1995).

Estudos de alimentação e pastejo demonstram que pequenas mudanças na digestibilidade da forragem tem um impacto significativo na performance animal, isto é, na produção de carne e leite (CASLER; VOGEL, 1999). Se uma maior porcentagem da energia presente na parede celular de forragens estivesse disponível ao animal haveria um considerável benefício econômico.

A relação entre lâminas e colmos é um parâmetro importante na avaliação da qualidade das forrageiras, sendo que o consumo voluntário de forragem está diretamente relacionado com a porcentagem de folhas de uma pastagem (RODRIGUES, 1986), visto que as folhas possuem valor nutritivo superior aos colmos (HERRERA, 1979). Além disso, as folhas perdem o valor nutritivo menos acentuadamente do que os colmos com a maturidade (HACKER; MINSON, 1981).

A avaliação da qualidade de colmos e folhas tem sido feita principalmente através da mensuração da digestibilidade da MS, porém a digestibilidade da fibra é um importante fator influenciando o consumo de MS. A fibra indigestível pode ocupar o trato digestivo reduzindo o espaço ruminal e o consumo de MS (THIAGO; GILL, 1990). Assim, o desempenho de animais a pasto depende não só da quantidade de parede celular, mas também da digestibilidade da mesma.

As frações colmo e folha possuem qualidades bromatológicas diferentes, e a maturidade afeta de maneira diferente as duas frações e, sendo assim, é importante que os programas de melhoramento de forrageiras atuem separadamente sobre as duas frações (WILSON, 1993).

Brito, Rodella e Deschamps (2003) demonstraram a existência de grande variação da DIVMS e DIVFDN da fração folha de *Brachiaria brizantha* de acordo com a altura de corte, sendo que a porção apical apresenta maior DIVMS e DIVFDN do que a porção basal, sem diferir quanto aos valores de FDN. Estes resultados sugerem que o decréscimo da DIVMS da fração folha com o avanço da maturidade estaria mais relacionado com o decréscimo na digestibilidade do FDN pelo processo de lignificação, do que com o acúmulo de parede celular. Outros autores encontraram aumento do teor de FDN das lâminas foliares de gramíneas colhidas com 60 ou 90 dias de crescimento, discordando dos resultados do presente estudo (WILMAN; MOGHADDAM, 1998).

A maior digestibilidade da fração colmo em estágios iniciais de desenvolvimento pode estar relacionada a maior presença de bainha foliar do que haste nesta fração. Wilman e Moghaddam (1998) relatam que bainha foliar da gramínea *Festuca arundinacea* é mais digestível do que lâmina foliar, quando a planta é cortada em idade jovem. Wilson (1976) relata que a bainha foliar de gramíneas pode ser mais jovem em desenvolvimento do que suas lâminas foliares, e pode ter fraco desenvolvimento de cutícula em bainhas revestidas por lâminas velhas, o que explicaria sua maior digestibilidade. Terry e Tilley (1964) também encontraram maior digestibilidade da bainha foliar em comparação a lâmina foliar de *F. arundinacea* quando cortada em estágios bem jovens de maturidade, relação que se inverte com o desenvolvimento da planta. Brito, Rodella e Deschamps (2003) relataram que a DIVFDN do colmo de *Brachiaria brizantha* colhido com 70 dias de crescimento foi superior a da fração folha, o que não ocorreu em *Brachiaria humidicula*.

É usual a adoção de práticas de manejo e a seleção de novas cultivares focando a manutenção de maior proporção de folhas (CARVALHO et al., 2001; SANTOS; BALSALOBRE; CORSI, 2003).

Apesar da grande produtividade das gramíneas tropicais, à medida que vai avançando o desenvolvimento vegetal, ocorre drástica diminuição do teor protéico e aumento do teor de fibra, associado ao aumento no teor de lignina, limitando a produção de carne e leite (EUCLIDES, 2001). A lignina forma uma barreira que impede a aderência microbiana e a hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose,

indisponibilizando os carboidratos estruturais potencialmente degradáveis, diminuindo a digestibilidade da fibra e a qualidade e o aproveitamento da forragem (RODRIGUES et al., 2004).

A lignificação e uma baixa digestibilidade do FDN é o fator limitante mais importante para a performance animal em sistemas baseados em forragens tropicais. (WATTIAUX; MERTENS; SATTER, 1991). A menor digestibilidade da MS de plantas em estágio avançado de desenvolvimento está normalmente associada com maiores teores de FDN (MERTENS, 1994).

As maiores mudanças que ocorrem na composição química das plantas forrageiras são aquelas que acompanham sua maturação. À medida que a planta envelhece, a proporção dos componentes potencialmente digestíveis tende a diminuir e a de fibras, aumentar (QUEIROZ FILHO; SILVA; NASCIMENTO, 2000). A digestibilidade da parede celular é um dos principais limitadores do desempenho de animais ruminantes em países tropicais (WATTIAUX; MERTENS; SATTER, 1991). Assim, é importante a seleção de novas forrageiras que possuam maior digestibilidade da FDN e que mantenham alta digestibilidade da FDN mesmo em estágios avançados de maturidade.

2.3 Caracterização dos genes ligados à lignificação

Devido aos enormes benefícios econômicos que podem ser atingidos, esforços consideráveis têm sido empregados nos países de clima temperado visando a redução do conteúdo de lignina ou a modificação de sua composição em plantas (JUNG; NI, 1998). Estes estudos foram voltados principalmente para espécies dicotiledôneas, como tabaco, *Arabidopsis thaliana*, alfafa e *Populus sp.* (BAUCHER et al., 1998; GRIMA-PETTENATI; GOFFNER, 1999; DIXON et al., 2001; HUMPHREYS; CHAPPLE, 2002). Em monocotiledôneas (gramíneas) existe um estudo com a redução na expressão de ácido caféico O-metiltransferase (COMT) em milho (PIQUEMAL et al., 2002) e outro com a redução na expressão de cinamoil álcool desidrogenase (CAD) em Festuca (CHEN et al., 2003).

Em países de clima tropical, como o nosso, a melhora na digestibilidade da forragem possui um impacto maior sobre a produção animal do que em países de

clima temperado, devido a menor digestibilidade das gramíneas tropicais de ciclo C_4 (45-55% de digestibilidade da MS) em relação às gramíneas temperadas de ciclo C_3 (50-80% de digestibilidade da MS) (VAN SOEST, 1994).

Apesar do enorme potencial de benefício da indústria pecuária, até o momento, não existe nenhum estudo publicado envolvendo a alteração da síntese de lignina em forrageiras tropicais. O processo de lignificação da parede celular de plantas influencia não somente a indústria pecuária, mas também é um componente indesejável na indústria de papel, porque a lignina precisa ser removida das fibras de madeira (BAUCHER et al., 1998). No Brasil, o processo de lignificação na cana-de-açúcar e no eucalipto tem sido alvo de estudos recentes (SELMAN-HOUSEIN et al., 1999; RAMOS et al., 2001; FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2002).

Obviamente, a alteração do conteúdo e composição da lignina passa pelo conhecimento da rota de síntese e das enzimas envolvidas na síntese de lignina. Os estudos de engenharia genética focaram na redução no nível de expressão de enzimas envolvidas no processo de lignificação, através da expressão de genes homólogos ou heterólogos, senso ou antisenso, em plantas transgênicas. Os esforços têm se concentrado principalmente em modificar os níveis de expressão dos genes de COMT, CAD e, mais recentemente, cinamoil-CoA redutase (CCR) (SEWALT et al., 1997; GUO et al., 2001; CHEN et al., 2003). De maneira geral, os estudos foram bem sucedidos em obter uma redução na concentração da lignina com um aumento ao redor de 15% na digestibilidade ruminal.

Dentre as gramíneas tropicais, somente na cana-de-açúcar já foram identificados etiquetas de expressão gênica (EST) da maioria das enzimas envolvidas com a lignificação (SELMAN-HOUSEIN et al., 1999; RAMOS et al., 2001). Nenhuma das enzimas envolvidas com lignificação já foi seqüenciada nas principais espécies forrageiras usadas no Brasil, como as dos gêneros *Panicum* e *Brachiaria*, que respondem por mais de 85% das sementes comercializadas. Em *Cynodon dactylum* (grama-bermuda), somente um pequeno trecho homólogo à enzima fenilalanina amônia liase (PAL) já foi seqüenciado (GenBank™ BQ826358).

3 HIPÓTESE

Nossa hipótese é a de que existe variação genética entre cultivares de *P. maximum* quanto ao efeito da maturidade sobre a qualidade da fração colmo e folha, bem como que a expressão diferencial dos genes envolvidos com a lignificação está correlacionada com a queda da digestibilidade da fibra.

4 OBJETIVOS

Objetivou-se avaliar o efeito da maturidade sobre a composição química e digestibilidade *in vitro* de genótipos de *P. maximum* colhidos em três idades de corte, bem como identificar e seqüenciar as principais enzimas envolvidas com a biossíntese da lignina (PAL, C4H, 4CL, CCR, CAD e COMT); e estudar o padrão de expressão gênica das enzimas, junto com o teor de lignina nos tecidos, visando a identificação das enzimas mais fortemente correlacionadas com o acúmulo de lignina e digestibilidade ruminal dos tecidos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi implantado no município de Campo Grande-MS (latitude 20° 26' S e longitude 54° 43' W). A altura local é de 530,7m, o solo tipo Neossolo e o clima, segundo a classificação do Instituto Nacional de Meteorologia-INMET, é do tipo tropical úmido, caracterizado por uma estação seca acentuada no inverno e chuvosa no verão.

Foi estabelecido um ensaio de avaliação de 11 genótipos de *P. maximum*: Cultivares Massai, Milênio, Mombaça e Tanzânia e acessos PM39, PM40, PM41, PM44, PM45, PM46 e PM47 em área da EMBRAPA Gado de Corte (CNPGC). As parcelas foram adubadas com 100/ha kg de N (uréia), 100/ha kg de P₂O₅ (superfosfato simples) e 100/ha kg de K₂O (cloreto de potássio). Após um corte de nivelamento a 20 cm do solo, no dia 29 de dezembro de 2005, as parcelas foram colhidas com 30, 60 e 90 dias de crescimento, sendo a 1ª coleta no dia 1º de fevereiro, a 2ª coleta no dia 1º de março e a 3ª coleta no dia 1º de abril de 2006. As parcelas eram formadas por 6 linhas espaçadas de 0,5 metros (m) por 4 m de comprimento, em um total de 10 m² por parcela. A cada data de corte, duas linhas foram cortadas a aproximadamente 20 cm do solo, para avaliação da produção de massa, proporção folha:colmo, composição bromatológica e expressão gênica.

A condição climática dentro do experimento se manteve dentro do padrão da época, sem ocorrência de falta de água por período prolongado (Tabela 1).

Tabela 1 - Temperatura e precipitação pluviométrica na região de Campo Grande-MS no período de 29/12/2005 a 01/04/2006

Período	29/12/2005 a 01/02/2006	02/02/2006 a 01/03/2006	02/03/2006 a 01/04/2006
Temperatura média (°C)	25,5	24,9	25,1
Precipitação acumulada (mm)	149,3	178,3	141,2

Fonte: EMBRAPA-CNPGC.

Após o corte das duas linhas, a massa total foi pesada e sub-amostrada para determinação da proporção folha:colmo. Cada sub-amostra, de aproximadamente 1,5 kg, foi pesada e separada em lâminas foliares (fração folha), bainhas foliares e

hastes (fração colmo) e material morto (fração morto). Amostras de folha e de colmo foram acondicionadas em sacos plásticos e permaneceram congeladas a -20°C para posterior análise da composição bromatológica e digestibilidade *in vitro*. Uma parte da sub-amostra de folha e de colmo, foi picada e acondicionada em tubos Falcon de 50 mL em nitrogênio líquido a -180°C para posterior extração do RNA total.

5.1 Análise bromatológica e de digestibilidade *in vitro*

As análises químicas foram realizadas no laboratório de bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP em Pirassununga-SP.

5.1.1 Análise de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN)

As análises bromatológicas de matéria seca (MS) e de proteína bruta (PB) foram realizadas segundo AOAC (1980) e de fibra em detergente neutro (FDN) segundo Goering e Van Soest (1970). A produção de matéria seca verde (MSV) foi calculada somando-se as frações colmo e folha. As amostras foram secas em estufa com ventilação forçada de ar a 55°C, por 72 horas. As amostras secas foram moídas com peneira de malha de 1 mm e posteriormente analisadas para determinação da MS, em estufa a 105°C por 24 horas.

Para análise da PB foram pesados 0,100 gramas (g) de tecido e colocado em um tubo de digestão seco. Adicionou-se 0,7 g da mistura de digestão (catalisador) determinada pelo método de Kjeldahl. Foi adicionado vagarosamente 2 mL de ácido sulfúrico (na capela). No bloco digestor o material foi colocado a 180°C e foi aumentada a temperatura aos poucos até 330°C (até clarear). Retiraram-se os tubos do bloco para esfriar. Adicionou-se pelas paredes do tubo 5 mL de água destilada (para dissolver o sal amônia formado). Logo então foi adicionado 10 mL de NaOH (Soda Cáustica) 10 N seguido de destilação imediata. O material destilado foi colocado num Erlenmeyer de 50 mL contendo 5 mL de indicador de ácido bórico. Foi

destilado até completar 35 mL de destilado e foi titulado com H_2SO_4 a 0,1 N (padronizado). Depois de realizada a titulação foi procedido o cálculo para calcular a porcentagem de nitrogênio e assim estimar a proteína bruta.

Para análise do FDN foi utilizada uma sub-amostragem de 0,35 gramas (g) em duplicata, previamente triturada em moinho com peneira de 1 mm, colocada em um tubo vidro, acrescentaram-se 35 mL de solução detergente neutro (temperatura ambiente) e o tubo de vidro foi tampado. Foi aquecido o banho-maria até a fervura (5 a 10 minutos), regulando a temperatura para evitar espuma e deixando em nível fixo durante 60 minutos, a partir do início da fervura a 105°C . Após 60 minutos, a solução foi filtrada em cadinho de vidro com placa porosa, por sucção a vácuo. O material foi lavado no cadinho com água destilada quente ($\sim 100^\circ\text{C}$) por duas vezes. Em seguida, o material foi lavado com 30 mL de acetona. O cadinho com placa porosa foi seco a 105°C durante 6 horas, após esfriado em dessecador por 1 hora e pesado para a determinação do FDN.

5.1.2 Análise de fibra em detergente ácido (FDA) e lignina

Os valores de fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram determinados segundo Goering e Van Soest (1970), onde uma sub-amostragem de 0,35 g de cada amostra e em duplicata foram pesadas e colocadas em um tubo de vidro com 35 mL da solução de detergente ácido e deixada por 60 minutos em banho-maria a 105°C com o tubo fechado. Após isso, as amostras são lavadas com água destilada quente e acetona em uma bomba a vácuo e levadas para uma estufa a 105°C onde permanecem por 6 horas. Quando retiradas da estufa as amostras ficam em dessecadores por 1 hora para esfriar e logo após são pesadas para a determinação do FDA.

Para a determinação da lignina, as mesmas amostras utilizadas para o FDA são submetidas a uma digestão ácida com ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 72% por 3 horas e logo após a solução foi filtrada em cadinho de vidro com placa porosa, por sucção a vácuo. O material foi lavado no cadinho com água destilada quente ($\sim 100^\circ\text{C}$) por duas vezes, tendo o cuidado de quebrar a crosta com bastão de vidro, a fim de facilitar a lavagem e remover todo complexo gelatinoso formado (proteína e

amido). Em seguida, o material foi lavado com 30 mL de acetona. O cadinho com placa porosa foi seco a 105°C, durante 6 horas, esfriado em dessecador e pesado. Após a pesagem, o cadinho foi colocado na mufla a 500°C por 4 horas, esfriado e pesado novamente para determinação da lignina.

5.1.3 Análise da digestibilidade *in vitro* da MS e do FDN

As frações colmo e folha foram analisadas para digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e digestibilidade *in vitro* da fibra detergente neutro (DIVFDN) conforme metodologia originalmente descrita por Goering e Van Soest (1970). Aproximadamente 1 g de amostra foi colocada em tubos de ensaio, previamente secos. Os tubos com as amostras foram incubados por 30 horas em solução de tampão e líquido ruminal a 39°C em estufa de temperatura controlada. Durante este tempo, os frascos foram agitados três vezes por dia.

Foram utilizadas as seguintes soluções:

- a) *Solução tampão ruminal* (H₂O destilada: 1 litro + Bicarbonato amônio (NH₄HCO₃): 4 g + Bicarbonato sódio (NaHCO₃): 35 g);
- b) *Solução macromineral* (H₂O destilada: 1 litro + Na₂HPO₄, anidro: 5,7 g + KH₂PO₄, anidro: 6,2 g + MgSO₄ • 7H₂O: 0,6 g);
- c) *Solução micromineral* (H₂O destilada: 100 mL + CaCl₂ • 2H₂O: 13,2 g + MnCl₂ • 4 H₂O: 10,0 g + CoCl₂ • 6 H₂O: 1,0 g + FeCl₃ • 6 H₂O: 8,0 g);
- d) *Solução de Goering (para 100 tubos)* (H₂O destilada: 2,046 L + Trypticase® Peptone: 10,23 g + Solução Micromineral: 0,512 mL + Solução Tampão ruminal: 1,023 L + Solução Macromineral: 1,023 L + Resazurina 0,1% (p/v): 0,512 mL);
- e) *Solução redutora (para 100 tubos)* (H₂O destilada: 190 mL + L(+)Cisteína HCl•H₂O: 1,25 g + 1 N NaOH: 8 mL + Na₂S•9H₂O: 1,25 g).

Adicionaram-se 40 mL da solução de Goering em cada tubo uma hora antes da adição do inoculo para umedecer a amostra. Adicionou-se cisteína-HCL, H₂O e NaOH e dissolveu-se os sólidos. Em seguida, Na₂S•9H₂O foi adicionado e dissolveu-se novamente.

Enquanto a solução redutora estava sendo agitada, os frascos foram colocados na estufa e adicionaram-se 2 mL de solução redutora a cada frasco. Os frascos foram tampados com rolha de borracha equipada com válvula de Bunsen e inoculados com CO₂ até a redução das amostras (a cor vermelha se tornou clara). Após a redução foi colocado o inoculo.

Para o preparo do inoculo, foi coletado fluído ruminal no rúmen ventral de três vacas fistuladas no rúmen, mantidas a pasto e recebendo suplementação mineral. O fluido ruminal foi filtrado em membrana de náilon e em seguida por lã de vidro para retirar as partículas menores e mantido sob CO₂ em garrafa térmica previamente aquecida com água quente.

Adicionaram-se 10 mL do inoculo a cada frasco, retirando-se a válvula de Bunsen. Os frascos foram agitados, vedados e CO₂ foi injetado nos frascos.

Para parar a fermentação, os frascos foram removidos da estufa e adicionaram-se 20 mL de solução detergente neutro. Foi colocada uma rolha em cada frasco e foram mantidos estocados a -20°C até análise do FDN. A solução foi transferida para um Becker de 600 mL, utilizando-se mais 80 mL de detergente neutro, e o teor de FDN foi determinado segundo Goering e Van Soest (1970). Apenas a fase fermentativa foi conduzida.

5.2 Extração do RNA total dos genótipos selecionados

Após a determinação da digestibilidade da FDN de todas as amostras, foram selecionados três genótipos que apresentaram lenta queda da digestibilidade da FDN do colmo com o avanço da maturidade (grupo LENTA), e três genótipos com rápida queda da digestibilidade do colmo com o avanço da maturidade (grupo RÁPIDA), totalizando assim 6 genótipos para o estudo da expressão gênica.

O RNA total foi isolado de 54 amostras referentes aos 6 genótipos selecionados (6 genótipos x 3 blocos x 3 idades). O isolamento do RNA total dos tecidos foi realizado utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante, que são baseadas no protocolo descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). Os tecidos coletados foram dissolvidos em Trizol e aliquoteados em tubos eppendorfs, finalizando um volume de 1 mL. A essa mistura foi adicionado 200 µL de

clorofórmio, agitado vigorosamente e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente (25°C). Após centrifugação a 12.000 X g por 15 minutos, a 4°C, a fase aquosa foi recuperada e a esta foram adicionados 500 µL de isopropanol, seguido de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugada a 10.000 X g, por 10 minutos, a 4°C e o precipitado de RNA lavado com 1 mL de etanol 75%, sendo procedida uma nova centrifugação a 10.000 X g, por 5 minutos a 4°C. O precipitado de RNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µL com água tratada DEPC (H₂O_{DEPC}) para posterior determinação da concentração de RNA total por espectrofotômetro. As amostras obtidas com este procedimento foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade do RNA total.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%. A cuba foi devidamente higienizada, para reduzir ou eliminar os possíveis contaminantes do ambiente. A cuba foi lavada com detergente neutro; enxaguada com água destilada; seca com álcool 70% e temperatura ambiente; deixada por 10 min em água oxigenada (H₂O₂) e enxaguada com H₂O_{DEPC}, deixando agir por 5 min e descartando-a.

Para o preparo do gel de agarose e corrida das amostras, foi produzida uma solução tampão TBE na concentração 5x. A partir desta solução tampão, foi feita uma diluição na concentração de 0,5x, onde a mesma é que foi utilizada na cuba de eletroforese e na preparação do gel de agarose. É importante utilizar o mesmo lote de TBE para fazer o gel e encher a cuba.

A preparação do gel foi realizada em um Erlenmeyer de 250 mL, onde foram colocados 50 mL de TBE 0,5x e 0,50 g de agarose; a solução foi aquecida em microondas até que as partículas brilhantes foram dissolvidas (~1 min); o frasco foi transferido para a bancada com o auxílio de luvas térmicas; quando a solução atingiu 55°C (morno), foram adicionados 2 µL de Brometo de Etídeo e este foi misturado suavemente agitando o frasco; a solução de agarose foi dispensada na cuba e foi utilizado o pente adequado para o número de amostras; esperou-se o gel endurecer (30-45 min) e foi colocado o TBE 0,5x até cobrir o gel (1 mm). Após o gel endurecer, se retirou as laterais da cuba e o pente. Em um microtubo (eppendorf) de 0,5 mL (separadamente um para cada amostra) foram misturados: 5 µL da amostra + 2 µL de loading + 3 µL de H₂O_{DEPC} e as amostras foram aquecidas a 85°C por 10 min em um Aquecedor de Bloco. As amostras foram aplicadas devagar nos pocinhos e a fonte foi ligada a 70 voltz, deixando a amostra correr por 60 min no gel.

Foi realizada ainda uma leitura em espectrofotômetro com o objetivo do conhecimento da concentração do RNA extraído e da razão no qual se encontra, sendo o segundo considerado um parâmetro de qualidade da amostra ou da extração.

5.3 Síntese de cDNA dos genótipos selecionados

Após a quantificação do RNA total, os três blocos de cada genótipo de *P. maximum* foram agrupados em um único tubo totalizando 18 amostras para síntese de cDNA (6 genótipos x 3 idades). A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o Kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen®).

Os cDNAs foram sintetizados a partir de 5 µg de RNA total das amostras de tecidos, 1 µL de oligonucleotídeo iniciador oligo (dT) a 0,5 µg/µL e 1 µL de dNTP (10 mM). Após a incubação a 65°C por 5 minutos, a reação foi resfriada em gelo por 1 minuto. A essa mistura foram adicionados 2 µL de tampão *RT* 10X, 4 µL de MgCl₂ (5 mM), 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de *Rnase OUT* (40 u/µL), em um volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 42°C por 2 minutos e adicionada 1 unidade da enzima *SuperScript II RT* (Invitrogen®).

A transcrição reversa foi feita a 42°C por 50 minutos, procedendo-se a inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. Para remover o RNA molde da molécula híbrida cDNA:RNA foi feita digestão com 1 unidade de *Rnase H* por 20 minutos a 37°C.

5.4 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos desenhados e utilizados no primeiro ano do projeto eram degenerados, e foram produzidos com base nas seqüências do milho e do arroz (Tabela 2).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR comum

Gene	Oligonucleotídeos	Tamanho dos fragmentos amplificados
GAPDH	F: 5'-GTTTCGTTGTTGGTGTCAACG-3' R: 5'-TCCAGTGCTGCT(A/G)GGAATGA-3'	247 pb
C4H	F: 5'-TCGCAGAGCTTCGAGTACAA-3' R: 5'-AGGACGTTGTC(G/A)TGGTTGAT-3'	230 pb
4CL	F: 5'-AGAACACCATCGAC(C/A)AGGAC-3' R: 5'-TGGATTTCGGTGAAGAA(G/A)ACC-3'	336 pb
CCR	F: 5'-CTGGTACTGCTACGG(C/G)AAGG-3' R: 5'-(G/C)A(A/T)CTTGTACGGCTGCTTCC-3'	394 pb
COMT	F: 5'-AAGAGCGACG(A/C)CCT(C/G)TAC(C/A)A-3' R: 5'-G(G/C)AG(G/C)GAGTAGCCGGTG(T/A)AG-3'	211 pb
CAD	F: 5'-ACATGGGCGTGAAGGT(G/A)GC -3' R: 5'-CTT(G/C)CCGTCCAGCTTCAG -3'	230 pb
PAL	F: 5'-AGGTCAACTCCGTGAACGAC -3' R: 5'-(G/C)GAGTTCACGTCCTGGTTGT -3'	347 pb

Os oligonucleotídeos que foram utilizados para a amplificação dos seis genes de interesse por PCR em tempo real (C4H, 4CL, CCR, COMT, CAD e PAL) e um gene controle (GAPDH), foram sintetizados de acordo com os resultados do seqüenciamento obtido no primeiro ano do projeto (Tabela 3). Antes de serem sintetizados, os oligonucleotídeos utilizados nas reações da qRT-PCR foram analisados no programa *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para verificar as suas especificidades. Os oligonucleotídeos foram diluídos em água, para obter a concentração final de 100 µM.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR em tempo real

Gene	Oligonucleotídeos	Tamanho dos fragmentos amplificados
GAPDH	F: 5'- GTTCGTTGTTGGTGTCAACC -3' R: 5'- TCCAGTGCTGCTGGGAATGA-3'	247 pb
C4H	F: 5'-TCGCAGAGCTTCGAGTACA-3' R: 5'- AGGACGTTGTCGTGGTTGAT-3'	230 pb
4CL	F: 5'-(T/A)GAACACCATCGAC(T/G)AGGAC-3' R: 5'- TGGATTTCGTGAAGAAGACC-3'	336 pb
CCR	F: 5'- CTGGTACTGCTACGGGAAGG-3' R: 5'- CATCTTGTACTCCTGCTTCC-3'	394 pb
COMT	F: 5'- AAGAGCGACGACCTGTACCA-3' R: 5'- GGAGGGAGTAGCCGGTGTAG-3'	211 pb
CAD	F: 5'-ACATGGGCGTGAAGGT(G/A)GC-3' R: 5'-CTT(G/C)CCGTCCAGCTTCAG-3'	230 pb
PAL	F: 5'- AGGTCAAATCCGTGAACGAC -3' R: 5'- GAGTTTCACGTCCTGGTTGT -3'	347 pb

5.5 Amplificação de cDNA por PCR

De modo a verificar a funcionalidade dos novos oligonucleotídeos, foi feita uma amostra composta por 1 μL de cada uma das 18 amostras de cDNA. Esta amostra composta foi utilizada em reação de cadeia da polimerase (as condições da PCR estão descritas na tabela 4). Para cada reação de amplificação dos genes de interesse, foi utilizado 1 μL de cDNA (diluído para 0,05 μL : 1 μL de cDNA e 19 μL de Água Mili-Q estéril), adicionado a 49 μL de reação composto pelos seguintes reagentes: 5 μL de tampão 10X (0,1 mM de EDTA, 1 mM de DTT e 20 mM de Tris-HCl pH 8,0), 1 μL de dNTP (10 mM), 1,5 μL de MgCl_2 (50 mM), 0,25 μL de enzima *Taq* DNA polimerase (5U/ μL), 1,25 μL de cada *primer* 10 mM (senso e anti-senso), completando com 38,75 μL de água Milli-Q estéril para o volume final de 50 μL . Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 1% e visualizados pelo software e Image Gauge versão 3.12 (Fuji Film).

Tabela 4 - Programa utilizado na amplificação dos genes

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação	94°C	45 segundos	44
Anelamento	55°C	30 segundos	
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão Final	72°C	1 minuto	1
Resfriamento	4°C	Indeterminado	

5.6 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento *ABI 7500 Sequence Detection System*® (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) utilizando o reagente *SYBR*® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), que contém o corante *SYBR*® *Green*, dNTPs, MgCl_2 , Tampão e *Taq* Ampli-Gold. Tendo sido feitas as devidas padronizações, as reações realizadas continham 12,5 μL do reagente *SYBR*® *Green PCR Master Mix*, 0,5 μL de amostra de cDNA e 1,5 μL de cada iniciador (100 μM), perfazendo um volume final de 25 μL . Em todas as reações,

foram feitos controles negativos, contendo água esterilizada em substituição às amostras. As reações foram preparadas em duplicata, em tubos com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. Os ciclos utilizados foram os seguintes 95°C por 10 min seguidos de 44 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e estocagem a 4°C.

Para certificação de que a fluorescência emitida não foi gerada por amplificação inespecífica dos oligonucleotídeos, foi feita a análise da curva de dissociação gerada pelo programa do aparelho. Esta curva baseia-se na temperatura de anelamento (T_M) específico de cada produto amplificado ou temperatura de dissociação, que é determinada pela sua composição de nucleotídeos. A cada variação da temperatura, que acontece entre 60°C à 95°C, logo após o término da PCR, são coletados dados de fluorescência. A curva de dissociação ocorre quando em determinada temperatura, o produto da PCR separa as fitas de DNA e ocorre a queda de fluorescência gerada pelo fluoróforo *SYBR® Green*, já que o mesmo intercala somente na dupla fita.

Para a quantificação dos resultados foi empregado o método de quantificação relativa descrita por Pfaffl (2001), uma vez que se desejava saber a diferença de expressão entre os grupos estudados, e não o número absoluto de cópias de cada gene.

A equação abaixo ilustra o método de quantificação relativa escolhido:

$$\text{Equação 1: Razão (R)} = \frac{(E \text{ gene de interesse})^{\Delta Ct \text{ alvo (Ct rápida-Ct lenta)}}}{(E \text{ GAPDH})^{\Delta Ct \text{ GAPDH (Ct rápida-Ct lenta)}}$$

Onde, E= eficiência da amplificação de cada gene; Ct= ciclo de início da detecção do produto amplificado; Δ= diferença entre amostra desconhecida *versus* o controle.

Esse método citado baseia-se na quantificação do gene de interesse em relação a um gene controle denominado referência ou controle, para que se minimizem as possíveis variações quanto à quantidade de RNA utilizada inicialmente e eficiência na transcrição reversa. Entretanto, para a realização das análises estatísticas, foram considerados os valores individuais de Cts. O método de expressão relativa foi usado para minimizar possíveis variações devido à eficiência da transcrição reversa e a quantidade do modelo utilizado.

5.7 Eficiência de amplificação

A equação para o cálculo da eficiência de amplificação foi utilizada na forma logarítmica. Relacionando os valores logarítmicos do produto de PCR (Log_2) *versus* o número de ciclos de amplificação, um gráfico linear pôde ser gerado. Este gráfico somente pode ser construído na fase exponencial da reação e é geralmente utilizado para acessar a eficiência de amplificação. Para calcular a eficiência de amplificação de todos os genes, foi construída uma curva de diluição em série de cDNA. A partir dos dados obtidos, produziu-se um gráfico do C_t (*threshold cycle* ou quantidade de ciclos necessários para amplificação do gene em questão) *versus* o Log_2 do número relativo de cópias da diluição em série. Uma regressão linear foi feita para determinar o coeficiente angular da reta, que é usado para determinar a eficiência de amplificação baseando-se na equação 2, descrita por Yuan et al. (2006):

$$\text{Equação 2: Eficiência} = 2^{(-1/\text{coeficiente angular da reta})}$$

Uma curva de diluição com uma série de concentrações de cDNA foi calculada para cada gene para obter uma eficiência de amplificação.

5.8 Análise estatística

Os dados foram analisados considerando-se o delineamento de blocos ao acaso, em esquema de parcela subdividida, sendo a data de corte (Maturidade) a parcela e os genótipos as sub-parcelas. A análise estatística foi realizada utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2000) segundo o modelo: $Y = \mu + \text{Genótipos} + \text{Maturidade} + \text{Bloco} + \text{Maturidade} \times \text{Bloco} + e$, aonde os termos Bloco e Maturidade $\times$ Bloco foram considerados como termos aleatórios.

Na presença de interação Maturidade × Genótipos, as médias dos genótipos em cada idade de corte foram comparadas utilizando-se o teste LSD protegido por Fisher a 5% de probabilidade (STEEL; TORRIE, 1980).

Para a análise estatística da expressão gênica também foi o procedimento MIXED (SAS INSTITUTE, 2000) para executar uma regressão linear simples para cada grupo baseado no modelo descrito por Yuan et al. (2006). Os intervalos de confiança para as inclinações foram avaliados. O ΔCt para cada gene (controle ou interesse) foi então calculado subtraindo o número Ct da amostra de interesse (LENTA) da amostra controle (RÁPIDA). Quando a eficiência de amplificação não foi diferente do que 1, a razão da expressão do gene foi calculada com a equação: Razão = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, enquanto que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{GAPDH} - \Delta Ct_{interesse}$.

Os dados foram analisados por meio de uma análise de covariância (ANCOVA), segundo modelo proposto por Yuan et al. (2006), considerando os efeitos fixos de tratamento, gene, e a interação do tratamento x gene. A hipótese nula foi aquela $GeneAlvo_{RÁPIDA} - GAPDH_{RÁPIDA} = GeneAlvo_{LENTA} - GAPDH_{LENTA}$, ou alternativamente: $(GeneAlvo_{RÁPIDA} - GeneAlvo_{LENTA}) - (GAPDH_{RÁPIDA} - GAPDH_{LENTA}) = 0$. O contraste foi usado para contrastar o efeito do tratamento e para estimativa de $\Delta\Delta Ct$, tão bem como seu erro padrão da média e intervalo de confiança de 95%.

Todos os valores de P foram derivados testando a hipótese nula que $\Delta\Delta Ct$ são iguais à zero (0). Então, um pequeno valor de P indica que o $\Delta\Delta Ct$ é significativamente diferente de 0, o qual demonstra um efeito significativo. O desvio padrão da razão foi derivado do desvio padrão do $\Delta\Delta Ct$.

Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo e a tendência foi considerada como $P < 0,10$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Resultados da bromatologia: produção e digestibilidade

Como podemos observar na Tabela 5, aos 90 dias de crescimento os cultivares Mombaça e Tanzânia haviam passado do seu IAF crítico (Carnevali, 2003; Barbosa, 2004). Como esperado, houve aumento linear na produção de matéria seca verde em todos os genótipos com o avanço da maturidade (Tabela 6). Este aumento na produção com o avanço na maturidade está relacionado com alongação do colmo, o que se traduz na redução média de 91,1% para 54,1% de folhas na massa total, quando os genótipos foram colhidos com 30 e 90 dias, respectivamente (Tabela 6). O aumento na contribuição de MS de colmos, em detrimento às folhas, que foi observado neste estudo, é comumente verificado em plantas forrageiras, sendo então mais evidente em gramíneas tropicais (CANO et al., 2004). Em trabalho semelhante com capim-elefante, Queiroz Filho, Silva e Nascimento (2000) observaram que a porcentagem de folhas diminuiu acentuadamente acima dos 60 dias de 62,9% para 51,4% aos 80 dias de idade. O autor relata ainda que as respostas foram lineares negativas para a porcentagem de folhas e a relação F/C e linear positiva para a porcentagem de colmos, em função das idades de corte aumentada.

A relação folha/colmo é de grande importância tanto para a nutrição animal como para o manejo das plantas forrageiras (QUEIROZ FILHO; SILVA; NASCIMENTO, 2000). Alta relação folha/colmo significa forragem de maior teor protéico, digestibilidade e consumo, capaz de atender as exigências nutricionais dos animais. Segundo Alcântara (1986), os maiores valores de PB e digestibilidade encontram-se nas folhas das gramíneas, estando, portanto, a qualidade da planta forrageira intimamente relacionada com a sua relação folha/colmo.

Houve interação significativa entre Maturidade x Genótipos para produção de MSV (matéria seca verde) e composição morfológica ($P < 0,05$ - tabela 6). Quanto à produção de MSV, houve diferença entre os genótipos somente quando colhidos com 90 dias de crescimento ($P < 0,05$ - tabela 6).

A produção total de MSV com 90 dias de crescimento variou de 9.035 kg/ha a 22.857 kg/ha, para os genótipos PM45 e Mombaça, respectivamente (Tabela 6). Dentre os cultivares avaliados, o capim Mombaça apresentou maior ($P<0,05$) produção de MSV com 90 dias do que os cultivares Massai e Tanzânia, e similar ($P=0,15$) ao cultivar Milênio (Tabela 6). A maior produção do capim Mombaça frente aos demais cultivares de *P. maximum* foi verificada em outros experimentos (CECATO et al., 2000; QUADROS et al., 2002).

Quanto à proporção de folhas, houve diferença entre os genótipos quando colhidos com 60 ou 90 dias de crescimento ($P<0,05$ - tabela 6). Dentro os cultivares testados, o Massai apresentou a menor elongação de colmos com o avanço da maturidade, mantendo 70,7% de folhas na MSV quando colhido com 90 dias, em comparação a aproximadamente 50% de folhas dos outros 3 cultivares avaliados (Tabela 6). A maior proporção de folhas do cultivar Massai em relação aos demais cultivares de *P. maximum* está de acordo com resultados anteriores (BRÂNCIO et al., 2003; EUCLIDES et al., 2008). Cecato et al. (2000) também não encontraram diferença no percentual de lâmina foliar dos cultivares Tanzânia e Mombaça, obtendo valores muito semelhantes ao aqui reportados. Já Quadros et al. (2002) encontraram um pequeno aumento na porcentagem de folhas do capim Mombaça quanto comparado ao capim Tanzânia (54% e 51%), ambos com 55-65 dias de crescimento, e relataram valores inferiores ao deste experimento.

A porcentagem média de material morto chegou a 15,1% com 90 dias de crescimento, sendo que houve diferença significativa ($P<0,01$) entre os genótipos quando colhidos com 60 ou 90 dias de crescimento (Tabela 6). Os cultivares Milênio e Mombaça apresentaram as menores ($P<0,05$) porcentagens de material morto, dentre os cultivares avaliados.

O teor de MS da fração colmo dos genótipos aumentou linearmente ($P<0,05$) com a maturidade, passando de 12,9% para 23,7%, quando colhidos com 30 ou 90 dias, respectivamente (Tabela 7). Houve diferença ($P<0,05$) entre os genótipos quanto ao teor de MS do colmo somente quando colhidos com 30 dias de crescimento (Tabela 7). Não houve diferença entre os genótipos quanto ao teor de PB do colmo nas três idades de corte. Em relação à média dos teores de PB do colmo, não houve diferença entre 30 e 60 dias de idade, e ocorreu queda acentuada dos 60 para os 90 dias de maturidade (Tabela 7). O teor de FDN do colmo aumentou linearmente com a maturidade, sendo que os genótipos só diferiram entre si

($P < 0,05$) quando colhidos com 30 dias de crescimento (Tabela 7). Dentro os cultivares testados, o cultivar Massai apresentou maior ($P < 0,05$) teor de FDN do colmo com 30 dias de crescimento do que os cultivares Milênio e Mombaça, e não diferiu ($P = 0,35$) do cultivar Tanzânia (Tabela 7).

Na média dos onze genótipos, não houve diferença no teor de lignina do colmo quando colhido com 30 ou 60 dias, sendo que houve aumento no conteúdo de lignina do colmo colhido com 90 dias de crescimento ($P < 0,05$ – tabela 7). Houve diferença entre os genótipos no teor de lignina do colmo somente quando colhidos com 90 dias de crescimento ($P < 0,05$ – tabela 7). Com 90 dias de crescimento, o cultivar Mombaça apresentou maior ($P < 0,05$) concentração de lignina (% FDN) no colmo do que os cultivares Massai e Tanzânia, e não diferiu ($P = 0,53$) do cultivar Milênio (Tabela 7). Os valores de FDN e lignina obtidos para a fração colmo, e a elevação destes valores com a maturidade são semelhantes aos reportados para três gramíneas por Wilman e Moghaddam (1998).

As maiores mudanças que ocorrem na composição química das plantas forrageiras são aquelas que acompanham sua maturação. À medida que a planta envelhece, a proporção dos componentes potencialmente digestíveis tende a diminuir e a de fibras, aumentar (QUEIROZ FILHO; SILVA; NASCIMENTO, 2000). Assim, é importante a seleção de novas forrageiras que possuam maior digestibilidade da FDN e que mantenham alta digestibilidade da FDN mesmo em estágios avançados de maturidade. As frações colmo e folhas possuem qualidade bromatológica diferente, e a maturidade afeta de maneira diferente as duas frações e, sendo assim, é importante que os programas de melhoramento de forrageiras atuem separadamente sobre as duas frações (WILSON, 1993).

Na média dos 11 genótipos de *P. Maximum* estudados, não houve diferença na DIVFDN ou DIVMS do colmo quando os genótipos foram colhidos com 30 ou 60 dias, sendo que com 90 dias houve decréscimo ($P < 0,05$) em ambos (Tabela 8). Houve diferença significativa entre os genótipos para a DIVMS e DIVFDN em todas as idades de corte, demonstrando o grande efeito genético sobre este parâmetro (Tabela 8). Entre os cultivares avaliados, o cultivar Massai apresentou os menores valores de DIVMS e DIVFDN do colmo com 30 dias, porém os maiores valores de DIVMS e DIVFDN do colmo com 90 dias de crescimento (Tabela 8). Os demais cultivares comerciais avaliados, Mombaça, Tanzânia e Milênio, apresentaram grande queda na DIVFDN e DIVMS de 60 para 90 dias de crescimento (Tabela 8).

Dentro os acessos avaliados, o PM39 e PM47 se destacaram pelos altos valores de DIVFDN do colmo em todas as idades e pequena queda na DIVFDN do colmo com o avanço da maturidade (Tabela 8).

Os teores de FDN e FDA, com 90 dias de crescimento para a fração colmo, 84,1 e 51,1%, respectivamente, são semelhantes aos encontrados por Dias et al. (2008), que encontraram 78,45% para o FDN e 52,10% para o FDA e estes teores elevados nessa idade podem ser responsáveis pela baixa DIVMS da fração colmo. Ao relacionarmos os resultados de DIVMS com a FDN, verificamos a coerência dos mesmos, pois, no geral, o incremento na FDN da forragem está associado ao incremento de parede celular, que promove redução na DIVMS (MATTOS, 1992; VAN SOEST, 1994; RÊGO, 2001). O teor de lignina na base da MS (%MS) foi a medida bromatológica melhor correlacionada com DIVMS do caule ($r = -0,91 - P < 0,001$); enquanto a lignina na base do FDN (%FDN) foi a medida melhor correlacionada com DIVFDN do caule ($r = -0,87 - P < 0,0001$) (Tabela 9).

Ao contrário do elevado efeito genético sobre a qualidade do colmo, houve pequena variação genotípica quanto à composição bromatológica e digestibilidade da fração folha (Tabelas 10 e 11). Os genótipos variaram ($P < 0,05$) somente quanto ao teor de lignina (%FDN) na folha quando colhidos com 90 dias de crescimento (Tabela 10).

Dentre os cultivares estudados, o capim Tanzânia apresentou menor ($P < 0,05$) teor de lignina (% FDN) na folha do que o cultivar Milênio, quando colhidos com 90 dias de crescimento (Tabela 10), e não diferiu dos demais. Este menor teor de lignina da folha do capim Tanzânia colhido com 90 dias de crescimento, não resultou em uma maior DIVFDN (Tabela 11).

Na média dos genótipos, houve aumento linear ($P < 0,05$) dos teores de MS, FDA e lignina da fração folha, e redução ($P < 0,05$) dos teores de DIVMS e DIVFDN com o avanço da maturidade (Tabelas 10 e 11). Quanto ao teor de FDN da fração folha, houve um pequeno aumento da concentração de FDN entre 30 e 60 dias, seguido por redução do teor de FDN entre 60 e 90 dias, sendo que não houve diferença entre 30 e 90 dias (Tabela 10).

Da mesma forma que ocorreu na fração colmo, não houve diferença na porcentagem média da PB da fração folha entre 30 e 60 dias de crescimento, e houve queda acentuada de 60 para 90 dias de crescimento (Tabela 10). Não houve

variação entre os genótipos estudados quanto ao teor de PB na fração folha (Tabela 10).

Comparando-se a fração colmo com a fração folha, nota-se que o colmo teve maiores valores de FDN e FDA nas três idades de corte, e maiores valores de lignina com 30 e 90 dias de crescimento (Tabela 12). No entanto, a fração colmo apresentou maior DIVMS com 60 dias de crescimento e maior DIVFDN com 30 e 60 dias de crescimento (Tabela 12). O que se observa é que o avanço da maturidade teve grande efeito sobre a qualidade da fração colmo, enquanto teve pequeno efeito sobre a qualidade da fração folha (Tabela 12). Com 30 ou 60 dias de crescimento, a digestibilidade da MS e da FDN da fração colmo foi igual ou superior a da fração folha. No entanto, após 90 dias de crescimento, a fração colmo apresentou menor DIVMS e igual DIVFDN que a fração folha (Tabela 12). Como se sabe, com o avanço da maturidade, ocorre uma queda na digestibilidade dos tecidos de forragens, e esta queda está associada ao acúmulo de lignina (BRITO; RODELLA; DESCHAMPS, 2003). Ainda, com os resultados observados, a idéia de Wilson (1993) é reforçada quando ele diz que o grau pelo qual as diferentes partes da planta e seus tecidos lignificam varia grandemente, se referindo ao colmo e a folha.

Contrariando os resultados aqui obtidos, Carvalho et al. (2001), falam que o acúmulo de colmos não é desejado, pois além de serem menos nutritivas e mais difíceis de serem ingeridas do que as folhas, os colmos prejudicam o processo de colheita de forragem realizado pelos animais. Em pastos manejados intensivamente, o controle de colmos torna-se um desafio em gramíneas tropicais (SANTOS; BALSALOBRE; CORSI, 1999; SANTOS; BALSALOBRE; CORSI, 2003) indicando que o momento de pastejo ou colheita da forragem para a produção de silagem é um ponto chave para o sucesso da exploração de pastagens tropicais. Isto ainda pode ser questionado, pois os colmos não são somente indesejáveis no total da MS da forrageira a ser utilizada, o que se faz necessário é o ponto correto a explorar a pastagem. Brito, Rodella e Deschamps (2003) encontraram que a DIVFDN do caule de *Brachiaria brizantha* colhida com 70 dias de crescimento foi superior a da porção limbo+bainha foliar, o que não ocorreu na *Brachiaria humidicula*. Wilman e Moghaddam (1998) relatam que a bainha foliar de *Festuca arundinacea* é mais digestível que lâmina foliar, quando a planta é cortada em idade jovem.

Wilson (1976) relata que a bainha foliar de gramíneas pode ser mais jovem em desenvolvimento do que suas lâminas foliares, e pode ter fraco desenvolvimento de

cutícula em bainhas revestidas por lâminas velhas, o que explicaria sua maior digestibilidade. Terry e Tilley (1964) encontraram maior digestibilidade da bainha foliar em comparação a lâmina foliar de *F. arundinacea* quando cortada em estágios bem jovens de maturidade, relação que se inverte com o desenvolvimento da planta.

Houve uma correlação negativa entre DIVFDN do colmo e % de colmo na MS, $r = -0,22$, $-0,51$ e $-0,48$ para 30, 60 e 90 dias, com $P = 0,24$, $0,003$ e $0,0045$ para 30, 60 e 90 dias, respectivamente. Quer dizer o seguinte: Os cultivares com maior percentagem de colmos com 60 e 90 dias tiveram a menor DIVFDN e DIVMS do colmo nestas datas. Não houve correlação significativa entre PMSV (produção de matéria seca verde) e DIVFDN com 60 e 90 dias ($r = -0,33$ e $-0,33$, e $P = 0,06$ e $0,07$, respectivamente). A digestibilidade da folha não se mostrou correlacionada com nenhum parâmetro produtivo. Correlação de $r = 0,62$ ($P=0,0001$) entre % de colmos e produção de matéria seca verde com 90 dias. Correlação de $r = 0,558$ ($P=0,0007$) com 60 dias, e de $r = 0,475$ ($P = 0,0052$) com 30 dias. Ou seja, os genótipos mais produtivos foram aqueles que apresentaram maior alongação de colmos.

Tabela 5 - Altura média de 11 genótipos de *P. maximum* colhidos em três idades de corte

Genótipos	30 dias	60 dias	90 dias
Massai	43,0	66,8 ^{DEF}	109,7 ^{CD}
Milênio	75,3	110,0 ^A	149,5 ^{AB}
Mombaça	62,0	106,7 ^A	145,2 ^{ABC}
Tanzânia	50,0	75,8 ^{CDEF}	119,8 ^{BCD}
PM39	49,5	101,7 ^{AB}	174,7 ^A
PM40	49,0	80,0 ^{CDE}	145,3 ^{ABC}
PM41	48,7	82,5 ^{BCDE}	108,8 ^{CD}
PM44	46,5	62,7 ^{EF}	95,5 ^D
PM45	45,3	58,5 ^F	84,0 ^D
PM46	57,0	92,5 ^{ABC}	147,0 ^{AB}
PM47	52,0	83,0 ^{BCD}	112,7 ^{BCD}
Média	52,6 ^c	83,6 ^b	126,6 ^a
EPM ¹	4,1	6,8	12,6
Significância Genótipo ²	ns	**	**

¹EPM: Erro padrão da média. ²Significância do Genótipo (Teste de Fisher): É o grau ou a presença de diferença significativa entre os cultivares no mesmo dia de corte. Esses são classificados como: ns: não significativo; **: significativo a 1%. ^{ABCDEF}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si. ^{abc}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (pelo Teste de Tukey).

Tabela 6 - Produção de matéria seca verde e proporção de folhas, colmos e material morto de 11 genótipos de *P. maximum* colhidos em três idades de corte

Dias de crescimento ²	PMSV ¹ , kg/ha			Folhas, %MS			Colmos, %MS			Material morto, %MS		
	30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d
Massai	3.071	4.571	12.580 ^{CD}	87,3	77,4 ^{BC}	70,7 ^A	12,7	12,4 ^{BCD}	14,6 ^C	-	10,1 ^{AB}	14,7 ^{BCD}
Milênio	4.467	7.067	22.857 ^{AB}	91,6	70,8 ^C	50,2 ^{BCD}	8,4	25,8 ^A	41,7 ^A	-	3,4 ^D	8,1 ^{EF}
Mombaça	3.938	7.014	18.238 ^A	96,0	81,9 ^{AB}	50,9 ^{BCD}	4,0	14,6 ^{BCD}	41,5 ^A	-	3,5 ^D	7,7 ^F
Tanzânia	3.294	5.701	14.907 ^{BCD}	84,3	76,7 ^{BC}	47,0 ^D	15,7	9,8 ^{CD}	33,9 ^{AB}	-	13,4 ^A	19,1 ^{ABC}
PM39	2.607	4.355	11.047 ^{ABC}	96,4	87,3 ^A	49,3 ^{CD}	3,6	6,4 ^D	38,0 ^{AB}	-	6,3 ^{BCD}	12,7 ^{CDEF}
PM40	3.066	4.432	12.160 ^{BCD}	89,9	86,7 ^A	58,5 ^{ABCD}	10,1	11,4 ^{BCD}	27,5 ^{ABC}	-	2,0 ^D	14,0 ^{BCDEF}
PM41	3.209	5.274	13.012 ^{BCD}	91,7	80,3 ^{AB}	63,2 ^{AB}	8,3	14,0 ^{BCD}	25,2 ^{BC}	-	5,7 ^{BCD}	11,6 ^{DEF}
PM44	3.118	5.003	12.664 ^{BCD}	88,9	71,6 ^C	47,6 ^D	11,1	19,4 ^{AB}	37,9 ^{AB}	-	9,0 ^{ABC}	14,6 ^{BCDE}
PM45	3.319	5.893	17.730 ^D	94,9	83,1 ^{AB}	61,3 ^{ABC}	5,1	7,1 ^D	16,4 ^C	-	9,8 ^{AB}	22,3 ^A
PM46	2.079	3.734	9.035 ^{BCD}	90,0	71,4 ^C	45,1 ^D	10,0	24,1 ^A	32,9 ^{AB}	-	4,5 ^{CD}	22,0 ^A
PM47	2.876	4.411	11.437 ^D	91,7	77,6 ^{BC}	51,9 ^{BCD}	8,3	18,1 ^{ABC}	28,5 ^{ABC}	-	4,2 ^{CD}	19,7 ^{AB}
Média	3.186 ^c	5.223 ^b	14.152 ^a	91,1 ^a	78,6 ^b	54,1 ^c	8,9 ^a	14,8 ^b	30,7 ^c	-	6,5 ^b	15,1 ^a
EPM ³	791	809	2.181	4,4	2,9	4,6	4,36	3,14	4,93	-	1,8	2,2
Significância Genótipo ⁴	ns	ns	*	ns	**	*	ns	**	**	-	**	**

¹PMSV: Produção de matéria seca verde, em kg/ha.

²Dias de crescimento: São os dias de crescimento da forrageira a contar a partir de um corte de nivelamento em 29/12/2005.

³EPM: Erro padrão da média.

⁴Significância do Genótipo (Teste de Fisher): É o grau ou a presença de diferença significativa entre os cultivares no mesmo dia de corte.

Esses são classificados como: ns: não significativo; *: significativo a 5%; **: significativo a 1%.

^{ABCDEF} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (pelo Teste de Tukey).

^{abc} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (pelo Teste de Tukey).

Tabela 7 - Composição bromatológica da fração colmo de 11 genótipos de *P. maximum* colhidos em três idades de corte

Dias de crescimento ¹	MS, %			PB, %MS			FDN, %MS			FDA, %MS			Lignina, %FDN		
	30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d
Massai	17,8 ^{AB}	20,6	25,7	4,8	6,6	3,7	79,8 ^A	83,5	85,0	43,6	46,2	48,0 ^C	7,2	6,5	8,2 ^B
Milênio	7,9 ^{ABC}	15,1	21,2	4,8	5,0	2,9	75,7 ^{CD}	79,1	84,0	43,8	45,2	51,7 ^{ABC}	5,6	6,8	9,7 ^{AB}
Mombaça	6,4 ^C	12,5	24,8	5,9	4,5	3,1	74,8 ^D	79,9	82,4	41,8	46,2	55,3 ^A	6,3	6,7	11,1 ^A
Tanzânia	14,0 ^{ABC}	13,5	23,7	4,2	4,7	2,4	78,1 ^{ABCD}	79,4	82,9	43,5	43,5	51,1 ^{ABC}	6,6	5,6	8,7 ^B
PM39	8,1 ^{BC}	14,0	21,4	3,9	5,1	3,3	76,1 ^{BCD}	79,1	85,8	41,7	44,9	50,9 ^{ABC}	5,5	5,5	8,1 ^B
PM40	14,2 ^{ABC}	20,2	22,0	4,0	4,5	3,0	78,0 ^{ABCD}	79,4	83,8	42,7	45,0	50,0 ^{ABC}	7,1	6,1	9,1 ^{AB}
PM41	12,8 ^{ABC}	16,7	23,5	4,6	5,0	3,5	78,0 ^{ABCD}	80,4	82,9	44,3	45,1	48,2 ^{BC}	6,9	5,9	8,4 ^B
PM44	18,7 ^A	17,9	25,2	4,2	4,6	2,8	79,7 ^{AB}	81,5	86,1	46,8	45,9	52,7 ^{ABC}	8,3	6,6	9,6 ^{AB}
PM45	13,6 ^{ABC}	15,8	24,9	4,1	4,1	3,4	80,9 ^A	81,7	83,1	47,6	46,7	50,8 ^{ABC}	7,6	6,3	9,5 ^{AB}
PM46	12,5 ^{ABC}	16,1	25,1	4,1	4,8	2,5	78,9 ^{ABC}	79,9	86,6	48,0	45,3	54,0 ^{AB}	6,6	5,6	10,0 ^{AB}
PM47	16,3 ^{ABC}	17,2	23,1	4,4	5,3	3,6	77,9 ^{ABCD}	80,0	82,4	42,7	43,9	48,7 ^{BC}	5,8	5,3	8,2 ^B
Média	12,9 ^c	16,3 ^b	23,7 ^a	4,4 ^{ab}	4,9 ^a	3,1 ^b	77,9 ^c	80,4 ^b	84,1 ^a	44,3 ^b	45,3 ^b	51,1 ^a	6,7 ^b	6,1 ^b	9,1 ^a
EPM ²	4,4	3,3	1,6	1,4	0,8	0,4	1,5	1,2	1,5	2,3	1,2	2,0	1,1	0,4	0,9
Significância Genótipo ³	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*

¹Dias de crescimento: São os dias de crescimento da forrageira a contar a partir de um corte de nivelamento em 29/12/2005. ²EPM: Erro padrão da média. ³Probabilidade de efeito significativo de genótipo (Teste de Fisher). Esses são classificados como: ns: *não significativo*; * P<0,05; **: P<0,01. ^{ABCD}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (pelo Teste de Tukey). ^{abc}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (pelo Teste de Tukey).

Tabela 8 - Digestibilidade *in vitro* da fração colmo de 11 genótipos de *P. maximum* colhidos em três idades de corte

Dias de crescimento ³	DIVMS ¹			DIVFDN ²		
	30d	60d	90d	30d	60d	90d
Massai	51,9 ^{BC}	52,8 ^{BCD}	43,9 ^{AB}	39,7 ^{BC}	43,4 ^{ABCD}	34,0 ^{AB}
Milênio	60,8 ^A	52,9 ^{BCD}	39,1 ^B	48,2 ^A	40,5 ^{BCD}	27,5 ^B
Mombaça	58,5 ^A	57,9 ^{ABC}	38,9 ^B	44,5 ^{ABC}	47,3 ^{ABC}	25,8 ^B
Tanzânia	58,7 ^A	56,1 ^{ABCD}	40,8 ^B	47,2 ^A	44,7 ^{ABC}	28,6 ^B
PM39	61,9 ^A	58,8 ^{AB}	47,4 ^{AB}	50,0 ^A	47,9 ^{ABC}	38,8 ^A
PM40	56,5 ^{ABC}	61,3 ^A	42,4 ^{AB}	44,3 ^{ABC}	51,3 ^A	31,2 ^{AB}
PM41	57,4 ^{AB}	58,8 ^{AB}	45,4 ^{AB}	45,4 ^{AB}	48,8 ^A	34,1 ^{AB}
PM44	52,5 ^{BC}	51,0 ^{CD}	39,0 ^B	40,4 ^{BC}	40,0 ^{CD}	29,1 ^B
PM45	49,9 ^C	56,1 ^{ABCD}	43,5 ^{AB}	38,1 ^C	46,0 ^{ABC}	32,1 ^{AB}
PM46	58,7 ^A	48,0 ^D	39,7 ^B	47,8 ^A	34,9 ^D	30,7 ^{AB}
PM47	60,3 ^A	58,5 ^{AB}	50,3 ^A	49,1 ^A	48,1 ^{AB}	39,6 ^A
Média	57,1 ^a	55,6 ^a	42,8 ^b	45,0 ^a	44,9 ^a	31,9 ^b
EPM ⁴	2,1	2,5	2,9	2,6	2,7	3,2
Significância Genótipo ⁵	*	*	*	*	*	*

¹DIVMS: Digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

²DIVFDN: Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro.

³Dias de crescimento: São os dias de crescimento da forrageira a contar a partir de um corte de nivelamento em 29/12/2005.

⁴EPM: Erro padrão da média.

⁵Significância do Genótipo (Teste de Fisher): Grau ou a presença de diferença significativa entre os cultivares no mesmo dia de corte. Esses são classificados como: *ns*: não significativo; *: significativo a 5%; **: significativo a 1%.

^{ABCD}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (pelo Teste de Tukey). ^{ab}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (pelo Teste de Tukey).

Tabela 9 - Matriz de correlações entre composição química e digestibilidade da MS e FDN da fração colmo e da fração folha de onze genótipos de *P. maximum* colhidos em três idades

	Fração Colmo		Fração Folha	
	DIVMS ¹	DIVFDN ²	DIVMS ¹	DIVFDN ²
DIVFDN ²	0,98**		0,97**	
FDN	-0,77**	-0,63**	-0,07	0,16
FDA	-0,85**	-0,79**	-0,26*	-0,24*
Lignina (%MS)	-0,91**	-0,87**	-0,23*	-0,22*
Lignina (%FDN)	-0,89**	-0,88**	-0,21*	-0,26*

¹DIVMS: Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (30h).

²DIVFDN: Digestibilidade *in vitro* da FDN (30h).

*: significativo a 5%; **: significativo a 1% (Teste de Fisher).

Tabela 10 - Composição bromatológica da fração folha de 11 genótipos de *P. maximum* colhidos em três idades de corte

Dias de crescimento ¹	MS, %			PB, %MS			FDN, %MS			FDA, %MS			Lignina, %FDN		
	30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d
Massai	26,8	29,5	31,7	8,7	10,1	6,9	77,5	76,8	76,8	38,5	40,8	40,3	5,3	6,0	6,5 ^{AB}
Milênio	25,4	28,5	29,8	9,0	9,7	6,9	76,4	76,5	75,5	38,8	41,3	41,8	5,2	6,3	6,8 ^A
Mombaça	24,9	23,8	31,3	9,9	9,0	7,0	73,5	76,7	72,7	36,9	41,7	41,1	5,3	5,9	6,3 ^{AB}
Tanzânia	23,3	25,6	31,1	9,5	9,5	6,7	72,9	77,0	74,6	37,4	40,0	42,0	4,6	5,1	5,5 ^B
PM39	20,2	27,4	30,5	8,8	8,0	6,4	72,6	77,0	71,6	37,4	40,0	42,9	5,1	5,9	7,3 ^A
PM40	26,9	28,0	30,9	8,4	9,3	6,2	72,9	74,7	71,8	36,7	40,0	42,4	4,9	5,3	7,1 ^A
PM41	24,6	25,7	32,6	9,4	9,8	7,3	76,0	77,0	75,5	39,0	40,6	40,7	4,9	5,4	6,4 ^{AB}
PM44	24,7	26,7	29,5	9,5	8,8	7,1	75,5	77,0	74,5	38,6	40,1	44,0	5,1	5,0	7,2 ^A
PM45	23,8	29,5	29,8	8,4	8,7	7,3	76,9	77,1	75,7	40,1	41,6	42,5	4,7	5,4	6,4 ^{AB}
PM46	28,3	27,2	30,6	8,4	8,8	7,4	74,1	77,0	73,1	39,0	42,3	43,0	5,4	5,5	6,3 ^{AB}
PM47	26,5	28,7	31,9	9,6	9,5	7,5	76,2	76,7	75,0	37,3	40,7	42,9	5,1	5,7	6,4 ^{AB}
Média	25,0 ^c	27,3 ^b	30,9 ^a	9,0 ^a	9,2 ^a	7,0 ^b	75,0 ^b	76,7 ^a	74,2 ^b	38,2 ^b	40,8 ^a	42,1 ^a	5,1 ^b	5,6 ^b	6,6 ^a
EPM ²	2,3	1,5	1,6	0,9	0,7	0,5	1,4	1,2	1,5	0,9	0,9	1,2	0,2	0,3	0,5
Significância Genótipo ³	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*

¹Dias de crescimento: São os dias de crescimento da forrageira a contar a partir de um corte de nivelamento em 29/12/2005. ²EPM: Erro padrão da média. ³Probabilidade de efeito significativo de genótipo (Teste de Fisher). Esses são classificados como: *ns*: não significativo; * P<0,05; **: P<0,01. ^{AB}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (pelo Teste de Tukey). ^{abc}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (pelo Teste de Tukey).

Tabela 11 - Digestibilidade *in vitro* da fração folha de 11 genótipos de *P. maximum* colhidos em três idades de corte

Dias de crescimento ³	DIVMS ¹			DIVFDN ²		
	30d	60d	90d	30d	60d	90d
Massai	49,0	51,6	54,2	34,2	36,7	40,6
Milênio	55,0	50,8	52,7	40,8	35,6	37,4
Mombaça	53,5	54,3	51,0	36,6	40,4	32,6
Tanzânia	56,2	50,6	49,1	39,8	35,8	31,5
PM39	58,7	45,0	53,3	43,1	28,4	36,6
PM40	58,1	47,0	47,2	42,3	29,0	26,6
PM41	53,6	54,5	48,8	39,0	40,9	32,1
PM44	52,7	44,1	45,1	37,2	27,4	26,0
PM45	53,6	43,0	44,5	39,7	26,2	27,9
PM46	56,4	52,3	51,2	41,0	38,1	33,5
PM47	49,2	52,8	42,0	33,6	38,4	22,9
Média	54,2 ^a	49,6 ^b	49,0 ^b	38,8 ^a	34,3 ^{ab}	31,6 ^b
EPM ⁴	3,7	4,1	4,1	5,1	5,5	5,9
Significância Genótipo ⁵	ns	ns	ns	ns	ns	ns

¹DIVMS: Digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

²DIVFDN: Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro.

³Dias de crescimento: São os dias de crescimento da forrageira a contar a partir de um corte de nivelamento em 29/12/2005.

⁴EPM: Erro padrão da média.

⁵Significância do Genótipo: É o grau ou a presença de diferença significativa entre os cultivares no mesmo dia de corte. Esses são classificados como: *ns*: não significativo; *: significativo a 5%; **: significativo a 1% (Teste de Fisher).

^{ab}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (pelo Teste de Tukey).

Tabela 12 - Composição química e digestibilidade *in vitro* da fração colmo e da fração folha de onze genótipos de *P. maximum* colhidos em três idades

Parâmetro	Dias de crescimento ³	Folha	Colmo	EPM ⁴
MS, %	30 d	25,0 ^a	12,9 ^b	0,9
	60 d	27,3 ^a	16,3 ^b	0,9
	90 d	30,9 ^a	23,7 ^b	0,8
PB, %MS	30 d	9,0 ^a	4,4 ^b	0,4
	60 d	9,2 ^a	4,9 ^b	0,3
	90 d	7,0 ^a	3,1 ^b	0,3
FDN, %MS	30 d	75,0 ^b	77,9 ^a	0,4
	60 d	76,7 ^b	80,4 ^a	0,5
	90 d	74,2 ^b	84,1 ^a	0,6
FDA, %MS	30 d	38,2 ^b	44,3 ^a	0,6
	60 d	40,8 ^b	45,3 ^a	0,4
	90 d	42,1 ^b	51,1 ^a	0,7
Lignina, %FDN	30 d	5,1 ^b	6,7 ^a	0,3
	60 d	5,6	6,1	0,2
	90 d	6,6 ^b	9,1 ^a	0,2
DIVMS ¹ , %MS	30 d	54,2	57,1	1,6
	60 d	49,6 ^b	55,6 ^a	1,1
	90 d	49,0 ^a	42,8 ^b	1,1
DIVFDN ² , %FDN	30 d	38,8 ^b	45,0 ^a	2,3
	60 d	34,3 ^b	44,9 ^a	1,3
	90 d	31,6	31,9	1,6

¹DIVMS: Digestibilidade *in vitro* da matéria seca. ²DIVFDN: Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro. ³Dias de crescimento a partir de corte de nivelamento em 29/12/2005. ⁴EPM: Erro padrão da média. ^{ab}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (pelo Teste de Tukey).

O interessante para programas de melhoramento seria identificar os genótipos mais produtivos e que apresentem colmos de alta DIVFDN com 60 ou 90 dias. A aplicação de agrupamento por otimização de Tocher utilizando a matriz de distâncias euclidiana média permitiu o estabelecimento de 4 grupos baseados nas variedades medidas com 90 dias de crescimento (Tabela 13).

O Grupo I representa os genótipos com produção intermediária de MSV, menor DIVFDN da fração colmo, e menor porcentagem de folhas com 90 dias de crescimento, e foi constituído pelos genótipos Tanzânia, PM46 e PM44. O Grupo II representa os genótipos com produção intermediária de MSV, maior DIVFDN do colmo e porcentagem de folhas com 90 dias de crescimento intermediária, e foi constituído pelos acessos PM39 e PM47. O Grupo III representa os genótipos com

menor produção de MSV, DIVFDN do colmo intermediária e maior porcentagem de folhas com 90 dias de crescimento, e foi constituído pelos genótipos Massai, PM40, PM41 e PM45. O Grupo IV representa os genótipos com maior produção de MSV, menor DIVFDN do colmo e porcentagem de folhas com 90 dias de crescimento intermediária, e foi constituído pelas cultivares Milênio e Mombaça. A partir desta análise verifica-se que os acessos PM39 e PM47 se mostraram genótipos promissores que agregam boa produção de MSV, boa porcentagem de folhas e alta DIVFDN do colmo com 90 dias de crescimento.

Tabela 13 - Grupos de genótipos de *P. maximum* e média das variáveis em cada grupo

Itens	Grupo			
	I	II	III	IV
	PM44 PM46 Tanzânia	PM39 PM47	Massai PM40 PM41 PM45	Milênio Mombaça
Distância média intragrupo	-	1,2054	1,4389	1,8935
PMSV ¹ (kg/ha)	13.216 ^{ab}	14.389 ^{ab}	11.537 ^b	20.547 ^a
DIVFDN ² do colmo (%FDN)	29,4 ^c	39,2 ^a	32,8 ^b	26,6 ^c
Folhas ³ (% MS)	46,6 ^b	50,6 ^b	63,4 ^a	50,5 ^b

¹PMSV: Produção de matéria seca verde com 90 dias, em kg/ha. ²DIVFDN = Digestibilidade *in vitro* (30h) da fibra em detergente neutro do colmo com 90 dias.

³Porcentagem de folhas na MSV com 90 dias de crescimento. ^{abc}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (pelo Teste de Tukey).

6.2 Seleção dos genótipos para estudo da expressão gênica

Os genótipos de *P. maximum* foram selecionados, baseado no seu perfil de manutenção da digestibilidade da FDN do colmo com o avanço da maturidade (Tabela 14).

Tabela 14 - DIVFDN do colmo de 11 genótipos de *P. maximum* colhidos em três idades de corte

Genótipos	30 dias	Genótipos	60 dias	Genótipos	90 dias
PM39	50,0 ^A	PM40	51,3 ^A	PM47	39,6 ^A
PM47	49,1 ^A	PM41	48,8 ^{AB}	PM39	38,8 ^A
Milênio	48,2 ^A	PM47	48,1 ^{ABC}	PM41	34,1 ^{ABC}
PM46	47,8 ^A	PM39	47,9 ^{ABC}	Massai	34,0 ^{ABC}
Tanzânia	47,2 ^A	Mombaça	47,3 ^{ABC}	PM45	32,1 ^{ABC}
PM41	45,4 ^{AB}	PM45	46,0 ^{ABC}	PM40	31,2 ^{ABC}
Mombaça	44,5 ^{ABC}	Tanzânia	44,7 ^{ABC}	PM46	30,7 ^{ABC}
PM40	44,3 ^{ABC}	Massai	43,4 ^{ABCD}	PM44	29,1 ^{BC}
PM44	40,4 ^{BCD}	Milênio	40,5 ^{BCD}	Tanzânia	28,6 ^{BC}
Massai	39,7 ^{BCD}	PM44	40,0 ^{CD}	Milênio	27,5 ^{BC}
PM45	38,2 ^{CD}	PM46	34,3 ^D	Mombaça	25,8 ^C
Média	44,5		44,9		32,3
EPM ¹	2,1		2,8		3,2

¹EPM: Erro padrão da média.

^{ABCD} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si pela análise de Tukey à 5%.

Como observado na tabela 14, os acessos PM39, PM47 e o cultivar Massai apresentaram uma manutenção desejável da DIVFDN, enquanto os cultivares Milênio, Tanzânia e Mombaça, apresentaram uma queda drástica da DIVFDN com o avanço da maturidade.

6.3 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de Agarose 1% permitiu identificar a integridade do RNA total extraído amostras de RNA total (Figura 1). A integridade do material é avaliada pela presença das bandas estruturais de RNA ribossômico (28S, 18S e 5,8S).

Figura 1 - Foto de géis de agarose 1% das 54 amostras de RNA total

6.4 Leitura em espectrofotômetro

Foi realizada a quantificação em espectrofotômetro, sendo analisadas a razão (A_{260}/A_{280}) e a concentração das amostras (Tabela 15).

Tabela 15 - Análise em espectrofotômetro do RNA total das amostras selecionadas de *P. maximum* (Continua)

Amostra	Razão 260/280	Concentração, µg/ml
1PH06	1,64	115
1PH023	1,62	216
1PH029	1,78	119
2PH06	1,72	180
2PH023	1,56	345
2PH029	1,69	650
3PH06	1,73	581
3PH023	1,72	194
3PH029	1,66	542
1PH09	1,680	418,0
1PH022	1,600	339,0
1PH032	1,540	528,0
2PH09	1,630	472,0
2PH022	1,440	381,0
2PH032	1,720	721,0
3PH09	1,480	253,0
3PH022	1,500	207,0
3PH032	1,700	601,0
1PH01	1,754	282,0
1PH016	1,696	212,0
1PH034	1,632	169,0
2PH01	1,759	347,0
2PH016	1,779	230,0
2PH034	1,741	575,0
3PH01	1,814	718,0
3PH016	1,658	271,0
3PH034	1,519	219,0
1PH02	1,512	193,1
1PH019	1,549	534
1PH031	1,791	365
2PH02	1,766	302,1
2PH019	1,711	221,4
2PH031	1,366	29,1
3PH02	1,769	374,4

Tabela 15 - Análise em espectrofotômetro do RNA total das amostras selecionadas de *P. maximum* (Conclusão)

Amostra	Razão 260/280	Concentração, µg/ml
3PH019	1,581	258,4
3PH031	1,716	406,1
1PH011	1,848	328,6
1PH017	1,791	333,3
1PH027	1,721	263,1
2PH011	1,817	490,4
2PH017	1,718	344,8
2PH027	1,649	276,1
3PH011	1,618	429,0
3PH017	1,692	521,4
3PH027	1,817	780,5
1PH03	1,466	488,8
1PH013	1,411	256,9
1PH025	1,631	264,7
2PH03	1,706	497,6
2PH013	1,566	351,0
2PH025	1,563	262,6
3PH03	1,495	339,0
3PH013	1,539	265,7
3PH025	1,864	1128,4

Algumas amostras demonstraram alto grau de degradação do RNA ou contaminação (Figura 1). Estas amostras tiveram seu RNA re-extraído anteriormente à síntese de cDNA.

6.5 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real

Obtivemos sucesso na quantificação da expressão dos seis genes de interesse, como pode ser visualizado na figura 2. Em cada rodada de amplificação, os acessos foram comparados dois a dois, um do grupo LENTA e outro do grupo RÁPIDA, sendo amplificados ao mesmo tempo um gene de interesse e mais o GAPDH nas três idade de corte. Em cada rodada de amplificação foram analisados 24 tubos (2 genótipos x 3 idades x 2 genes x 2 repetições).

Figura 2 - Curvas de amplificação dos genes CAD, CCR, COMT, 4CL, PAL e C4H por PCR em tempo real

A especificidade da amplificação de cada gene pode ser observada na figura 3. Em todos os genes observa-se um único pico em cada gráfico, demonstrado a especificidade do produto amplificado.

Figura 3 - Curvas de dissociação dos genes CAD, CCR, COMT, 4CL, PAL e C4H amplificados por PCR em tempo real

6.5.1 Eficiência de amplificação

Os sete genes amplificados apresentaram eficiência de amplificação próxima a 2, ou seja, coeficiente de inclinação da curva linear = 1, como pode ser observado na figura 4.

Figura 4 - Validação do ensaio de PCR quantitativo. Nós testamos as suposições que as eficiências de amplificação dos genes GAPDH, 4CL, C4H, CAD, COMT, CCR e PAL nas reações de PCR são similares e próximas a 2,0 (100%). Quantidades diferentes de conjuntos de amostras de cDNA do colmo de *P. maximum* correspondentes a 0,0015, 0,015 e 0,15 μ g de RNA total foram utilizadas para gerar curvas padrões. Insertos nestes gráficos são curvas de unidades de fluorescência relativas plotadas contra número de ciclos de PCR. As eficiências de amplificação definidas como aumento do produto por ciclo foram calculadas como $2^{(-1/\text{slope})}$. Estes dados demonstram que as eficiências de amplificação destes genes foram similares e próximas a 100%

6.5.2 Quantificação da expressão das 54 amostras

Após a otimização das condições para cada gene, foi obtido sucesso na quantificação da expressão de todos os genes por PCR em tempo real (Tabela 16). Cada gene foi amplificação em 3 rodadas, consistindo da amplificação de um gene de interesse mais o GAPDH em conjunto para dois genótipos, um de cada grupo,

nas três idades de corte, perfazendo um total de 24 tubos mais 2 tubos de controle negativo (2 genótipos x 2 genes x 3 idades x 2 repetições).

Tabela 16 - Ciclo de limiar de detecção do corante SYBR-Green (Ct)

Genótipo	Idade	GAPDH	C4H	4CL	CAD	CCR	COMT	PAL
MASSAI	30	21,0	24,4	26,7	26,9	24,7	26,1	30,2
MASSAI	60	17,7	24,3	27,0	27,2	25,5	26,7	29,9
MASSAI	90	19,4	24,2	26,7	28,0	25,2	28,2	31,2
MILÊNIO	30	22,7	32,5	27,9	28,9	28,2	36,4	33,8
MILÊNIO	60	21,5	26,4	27,3	27,2	29,2	29,4	34,2
MILÊNIO	90	19,5	27,0	28,6	27,4	27,9	28,9	32,6
MOMBAÇA	30	22,0	29,0	25,2	30,1	25,5	29,0	31,1
MOMBAÇA	60	22,6	27,1	25,3	29,9	26,9	27,1	30,0
MOMBAÇA	90	22,1	28,3	25,2	28,2	25,9	29,2	31,1
PM39	30	21,3	27,3	26,1	26,2	23,1	26,3	33,2
PM39	60	22,7	29,4	26,4	29,3	25,8	28,1	34,6
PM39	90	22,1	26,5	24,5	27,9	23,9	26,0	34,2
PM47	30	21,3	27,9	30,3	27,3	24,8	25,5	30,2
PM47	60	24,9	29,1	33,5	30,6	27,3	29,7	31,3
PM47	90	24,8	28,9	32,4	31,0	28,1	28,0	31,3
TANZANIA	30	23,0	29,5	30,6	27,6	31,0	29,2	36,6
TANZANIA	60	21,9	27,1	29,3	26,8	31,0	28,6	32,5
TANZANIA	90	22,3	28,7	30,4	28,2	28,3	28,8	36,6

Encontramos na tabela 17 os resultados da quantificação da expressão gênica de acordo com os grupos de digestibilidade da FDN. Os valores de GAPDH presentes na tabela 17 é uma média das amplificações, sendo que para determinar os valores de ΔCT de cada gene (Tabela 18), foram utilizados os valores de Ct de GAPDH de cada rodada.

Tabela 17 - Efeito de tratamento (LENTA vs. RÁPIDA) sobre a expressão de genes da via de lignificação medida através do ciclo de limiar de detecção do corante SYBR-Green (Ct)

Tratamento	Idade	GAPDH	C4H	4CL	CAD	CCR	COMT	PAL
LENTA	1	21,2	26,5	27,7	26,8	24,2	26,0	31,2
LENTA	2	21,8	27,6	28,9	29,0	26,2	28,1	31,9
LENTA	3	22,1	26,5	27,9	28,9	25,7	27,4	32,2
RÁPIDA	1	22,6	30,3	27,5	28,7	28,1	31,5	33,7
RÁPIDA	2	22,0	26,8	27,0	28,0	29,0	28,4	32,2
RÁPIDA	3	21,3	28,0	28,1	28,0	27,4	29,0	33,4

Tabela 18 - Efeito de tratamento (LENTA vs. RÁPIDA) sobre a expressão de genes da via de lignificação medida através do ΔCT ($Ct_{GAPDH} - \Delta Ct_{gene\ alvo}$). Quanto maior (mais próximo de 0) o número de ΔCT , maior a expressão do gene

Tratamento	Idade	COMT	PAL	4CL	C4H	CAD	CCR
LENTA	30	-4,77	-9,5	-7,03	-5,9	-5,77	-3,05
LENTA	60	-6,38	-10,5	-6,78	-5,4	-6,38	-3,76
LENTA	90	-5,31	-11,0	-5,35	-4,0	-6,31	-2,38
RÁPIDA	30	-8,97	-12,1	-7,25	-7,1	-5,56	-6,39
RÁPIDA	60	-6,36	-10,2	-6,77	-5,5	-5,38	-7,24
RÁPIDA	90	-7,66	-12,1	-6,30	-6,2	-5,66	-5,01

A análise estatística preliminar demonstrou o efeito de tratamento na expressão dos genes C4H, 4CL, CCR e COMT. Não foi encontrada variação na expressão dos genes CAD e PAL (Tabela 19).

Tabela 19 - Valor de P para efeito de idade de corte dentro de tratamento ou efeito de tratamento dentro de idade de corte

Efeito	Tratamento	Idade	C4H	4CL	CAD	CCR	COMT	PAL
Trt*Idade	LENTA		0,004	0,002	0,484	0,285	0,167	0,261
Trt*Idade	RÁPIDA		0,012	0,276	0,881	0,046	0,016	0,086
Trt*Idade		1	0,069	0,939	0,808	0,014	0,032	0,168
Trt*Idade		2	0,917	0,977	0,225	0,006	0,994	0,858
Trt*Idade		3	0,003	0,663	0,425	0,033	0,216	0,517

Houve efeito de idade e interação tratamento x idade para a expressão do gene C4H. A expressão do gene C4H aumentou com o avanço da maturidade no grupo de LENTA queda da digestibilidade, principalmente de 60 para 90 dias de crescimento, enquanto que no grupo de RÁPIDA queda da digestibilidade, a expressão de C4H aumentou mais de 30 para 60 dias, de crescimento, sofrendo queda na expressão com 90 dias de crescimento (Figura 5). A expressão de C4H foi maior no grupo LENTA do que RÁPIDA com 90 dias de crescimento.

Figura 5 - Efeito de tratamento sobre a expressão do gene C4H em três idades de corte

Houve efeito significativo de idade sobre a expressão do gene 4CL, sendo que a expressão do gene 4CL foi alterada pela maturidade somente no grupo de LENTA queda da digestibilidade, sofrendo aumento na sua expressão com o avanço da maturidade (Figura 6). Este resultado de expressão do gene 4CL vai contra a hipótese de que haveria um aumento na expressão dos genes de lignificação no grupo de RÁPIDA queda da DIVFDN, que possuíam maior teor de lignina no colmo. Não houve diferença entre os grupos quanto à expressão de 4CL em cada idade de corte.

Figura 6 - Efeito de tratamento sobre a expressão do gene 4CL em três idades de corte

Quanto ao gene CCR, houve efeito significativo de tratamento e de idade, a interação tratamento x idade não foi significativa. Mesmo não sendo significativa, a decomposição da interação pela opção SLICE do SAS demonstra que o efeito da maturidade foi significativo apenas no grupo de RÁPIDA queda da digestibilidade, sendo que a expressão de CCR aumentou com o avanço da maturidade (Figura 7).

Figura 7 - Efeito de tratamento sobre a expressão do gene CCR em três idades de corte

Não houve efeito significativo da maturidade sobre a expressão de CCR no grupo de LENTA queda de digestibilidade. Estas características posicionam o gene CCR como um possível regulador da digestibilidade do colmo de *P. maximum*. No entanto, a expressão de CCR foi sempre maior no grupo de LENTA queda do que no grupo de RÁPIDA queda, indicando que a mudança do nível de expressão ao longo do desenvolvimento seria mais importante para determinar a queda da digestibilidade do que a quantidade absoluta de expressão (Figura 7).

Para o gene COMT, houve efeito significativo da interação tratamento x idade. A decomposição da interação demonstrou que houve efeito da maturidade somente no grupo de RÁPIDA queda da digestibilidade, o que também posiciona este gene como possível modulador da lignificação e digestibilidade do colmo (Figura 8).

Figura 8 - Efeito de tratamento sobre a expressão do gene COMT em três idades de corte

A análise da mudança de expressão em relação ao nível de expressão com 30 dias demonstra que houve um maior aumento da expressão de COMT com 60 dias no grupo de RÁPIDA queda do que no de LENTA queda, sendo que após 90 dias de crescimento não houve diferença entre os grupos (Figura 8).

Com relação ao gene PAL, não houve efeito significativo de tratamento, idade ou da interação tratamento x idade. No entanto, ao se analisar a mudança na expressão de PAL com relação aos valores iniciais (30 dias), observa-se que houve um maior aumento na expressão de PAL de 30 para 60 dias de crescimento no grupo de RÁPIDA queda da digestibilidade (Figura 9), sendo que com 90 dias não houve diferença entre os grupos.

Figura 9 - Efeito de tratamento sobre a expressão do gene PAL em três idades de corte

Não houve nenhum efeito significativo sobre a expressão do gene CAD entre os dois grupos estudados (Figura 10).

Figura 10 - Efeito de tratamento sobre a expressão do gene CAD em três idades de corte

Piquemal et al. (2002) avaliaram o efeito da regulação da enzima COMT no conteúdo da FDN e na digestibilidade *in vitro* do FDN no milho. O teor de lignina nos milhos com o seu perfil alterado foi de 25 a 30% menor comparados com os controles. Em relação à digestibilidade, as linhagens alteradas foram mais digestíveis que as controle, conforme indicado pelo seu valor da DIVFDN mais elevada (84% versus 77%, respectivamente). Neste estudo, uma redução de 85% na atividade da COMT no estágio de florescimento foi suficiente para causar a diminuição no teor de lignina. Em um estudo semelhante, Mechin et al. (2000) relatou valores aumentados na DIVFDN para uma espécie de milho mutante em comparação a controle.

Alguns estudos têm sido relatados sobre os efeitos da regulação da COMT e uma baixa atividade no conteúdo de lignina e composição de plantas dicotiledôneas (DWIVEDI et al., 1994; NI; PAIVA; DIXON, 1994; ATANASSOVA et al., 1995; VAN DOORSSELAERE et al., 1995; TSAI et al., 1998; LAPIERRE et al., 1999; JOUANIN et al., 2000; GUO et al., 2001). Segundo Piquemal et al. (2002), as abordagens com

transgênicos em espécies gramíneas, até agora não tem sido utilizadas para regular a expressão dos genes ligados à lignificação.

É provável que a regulação da COMT altere a organização global da parede celular através de interações lignina-polissacarídeo modificado de uma forma que paredes são mais facilmente acessíveis às enzimas bacterianas. Além da digestibilidade, outras características agronomicamente importantes das gramíneas com estas enzimas, como a COMT, reguladas devem ser avaliadas para determinar se as características dessas plantas podem melhor se adaptar em condições a campo.

Chen et al. (2003) realizando experimento com *Festuca arundinacea* transgênica encontraram níveis reduzidos de RNAm transcriptase que reduziu significativamente a atividade enzimática do CAD. Estas alterações causaram uma diminuição significativa do conteúdo de lignina, sem alterar a celulose e hemicelulose. Em relação à digestibilidade *in vitro* da MS, os autores relataram aumentos de 7,2 a 9,5% nestas plantas com o conteúdo de CAD regulado.

Outro fator importante a ser observado no experimento anteriormente citado, é de que não foram encontradas grandes diferenças significativas entre as plantas transgênicas e as controles em relação aos caracteres agrônômicos como altura, hábito de crescimento, número de perfilhos e produção de sementes. Não foram observadas também alterações relativas à incidência de pragas ou agentes patogênicos nas plantas transgênicas.

Comparando os resultados obtidos por Chen et al. (2003), o nível de redução de lignina foi modesto quando comparado com os 50% de redução no teor de lignina em tabaco transgênico obtido pela regulação das enzimas CAD e CCR (CHABANNES et al., 2001).

Em gramíneas forrageiras, pouca informação sobre manipulação transgênica está disponível nessas espécies. Os poucos resultados sobre o êxito da modificação da lignina em espécies forrageiras é devido principalmente à identificação de plantas transgênicas que expressem mudanças na lignina e que estabeleçam um eficiente sistema de transformação destas espécies. E, a manipulação genética para aumentar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca das gramíneas forrageiras pode levar ao rápido benefício financeiro da sociedade e para a comunidade agrícola (CASLER; VOGEL, 1999).

7 CONCLUSÕES

A maturidade tem maior efeito sobre a qualidade nutricional da fração colmo do que sobre a fração folha. Existe grande variação entre os genótipos em relação ao efeito da maturidade sobre a digestibilidade da fração colmo, porém não há efeito dos genótipos sobre a digestibilidade da fração folha, indicando a possibilidade de seleção de cultivares com maior digestibilidade de colmos, e a dificuldade de se selecionar genótipos com maior digestibilidade de folhas. Dentre os genótipos testados, os acessos PM39 e PM47 se destacaram por apresentar boa produção de MSV e alta digestibilidade da FDN do colmo quando colhidos com 90 dias.

A quantificação da expressão gênica em genótipos contrastantes quanto à digestibilidade da fibra do colmo, identificou os genes C4H, COMT e PAL como expressos diferencialmente entre os grupos de RÁPIDA e LENTA queda da digestibilidade da FDN do colmo, colocando-os como possíveis moduladores da lignificação em *P. maximum*.

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL 2004: anuário da agricultura brasileira. São Paulo : FNP, 2004.

AGUIAR, R. S.; VASQUEZ, H. M.; SILVA, J. F. C. Produção e composição químico-bromatológica do capim-furachão (*Panicum repens* L.) sob adubação e diferentes idades de corte. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 29, n. 2, p. 325-333, 2000.

ALCÂNTRA, P. B. Origem das braquiárias e suas características morfológicas de interesse forrageiro. In: ENCONTRO PARA DISCUSSÃO SOBRE CAPINS DO GÊNERO BRACHIARIA, 1986, Nova Odessa. **Resumos...** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1986. p. 1-14.

ALCÂNTARA, P. B.; ALMEIDA, A. R. P.; BRAUN, G. Idade das plantas e seu efeito em características fisiológicas e de valor nutritivo para *Brachiaria brizantha*, *Paspalum coryphaeum* e *Heteropogon* sp. In: REUNIÃO BRASILEIRA ANUAL DE ZOOTECNIA, 33, 1996, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: SBZ, 1996. p. 13-15.

ANUALPEC 2004: anuário estatístico da produção animal. São Paulo: FNP, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 10. ed. Washington: AOAC International, 1980. 1015 p.

ATANASSOVA, R.; FAVET, N.; MARTZ, F.; CHABBERT, B.; TOLLIER, M. T.; MONTIES, B.; FRITIG, B.; LEGRAND, M. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. **The Plant Journal**, v. 8, p. 465-477, 1995.

BALSALOBRE, M. A. A. **Desempenho de vacas em lactação sob pastejo rotacionado de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum)**. 1996. 139 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

BARBOSA, M. A. A. F.; DAMASCENO, J. C.; CECATO, U.; SAKAGUTI, E. S. Estudo de perfilhamento em 4 cultivares de *Panicum maximum* Jacq. submetidos à duas alturas de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBZ, 1996. p. 109-111.

BARBOSA, R. A. **Características morfofisiológicas e acúmulo de forragem em capim Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv Tanzânia) submetido a frequências e intensidades de pastejo**. 2004. 122 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

BAUCHER, M.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Critical Reviews in Plant Sci.**, v. 17, p. 125-197, 1998.

BRAGA, A. P.; RIBEIRO, H. U.; BARRA, P. B.; BARRA, S. B.; VASCONSELOS, S. H. L.; BRAGA, Z. C. A. C. Composição químico-bromatológica das silagens de capim-elefante cv. Cameron em cinco idades de corte. **Caatinga**, v. 14, n. 1/2, p. 17-23, dez. 2001.

BRÂNCIO, P. A.; EUCLIDES, V. P. B.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; FONSECA, D. M.; ALMEIDA, R. G.; MACEDO, M. C. M.; BARBOSA, R. A. Avaliação de três cultivares de *Panicum maximum* Jacq. sob pastejo: disponibilidade de forragem, altura do resíduo pós-pastejo e participação de folhas, colmos e material morto. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 32, p. 55-63, 2003.

BRITO, C. J. F. A.; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F.C. Perfil químico da parede celular e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 32, p. 1835-1844, 2003.

BUXTON, D. R.; REDFEARN, D. D. Plant limitations to fiber digestion and utilization. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. S814-S818, 1997.

CAMM, E. L. T. G. H. N. Phenylalanine ammonia-lyase. **Phytochemistry**, v. 12, p. 961-973, 1973.

CAMPBELL, M. M.; SEDEROFF, R. R. Variation in lignin content and composition - mechanism of control and implications for the genetic improvement of plants. **Plant Physiology**, v. 110, p. 3-13, 1996.

CANO, C. C. P.; CECATO, U.; CANTO, M. W.; RODRIGUES, A. B.; JOBIM, C. C.; RODRIGUES, A. C.; GALBEIRO, S.; NASCIMENTO, W. G. Produção de forragem do capim-tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia-1) pastejado em diferentes alturas. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 33, p. 1949-1958, 2004.

CARNEVALLI, R. A. **Dinâmica da rebrotação de pastos de capim-mombaça submetidos a regimes de desfolhação intermitente**. 2003. 149 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CARVALHO, P. C. F.; RIBEIRO FILHO, H. M. N.; POLI, C. H. E. C.; MORAES, A.; DELAGARDE, R. Importância da estrutura da pastagem na ingestão e seleção de dietas pelo animal em pastejo. In: MATTOS, W. R. S. (Ed.) **Produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 853-871.

CASLER, M. D.; BUXTON, D. R.; VOGEL, K. P. Genetic modification of lignin concentration affects fitness of perennial herbaceous plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 127-131, 2002.

CASLER, M. D.; VOGEL, K. P. Accomplishments and impact from breeding for increased forage nutritional value. **Crop Science**, v. 39, p. 12-20, 1999.

CECATO, U.; MACHADO, A. O.; MARTINS, E. N.; PEREIRA, L. A. F.; BARBOSA, M. A. A. F.; SANTOS, G. T. Avaliação da produção e de algumas características da rebrota de cultivares e acessos de *Panicum maximum* Jacq. sob duas alturas de corte. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 29, n. 3, p. 660-668, 2000.

CECATO, U.; MARCO, A. A. F. B.; SAKAGUTI, E. S.; DAMASCENO, J. C.; SUZUKI, E.; MEURER, F. Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* Jacq. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBZ, 1996. p. 403-406.

CHABANNES, M.; BARAKATE, A.; LAPIERRE, C.; MARITA, J. M.; RALPH, J.; PEAN, M.; DANOUN, S.; HALPIN, C.; GRIMA-PETTENATI, J.; BOUDET, A. M. Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. **The Plant Journal**. v. 28, p. 257-270, 2001.

CHEN, L.; AUH, C. K.; DOWLING, P.; BELL, J.; CHEN, F.; HOPKINS, A.; DIXON, R. A.; WANG, Z. Y. Improved forage digestibility of tall fescue (*Festuca Arundinacea*) by transgenic down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. **Plant Biotechnology Journal**, v. 1, p. 437-449, 2003.

CHERNEY, J. H.; CHERNEY, D. J. R.; AKIN, D. E.; AXTELL, J. D. Potential of brown-midrib, low-lignin mutants for improving forage quality. **Advances in Agronomy**, v. 46, p. 157-198, 1991.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extration. **Anal. Bioch.** 162:156-9, 1987.

COSTA, K. A. P.; OLIVEIRA, I. P.; FAQUIN, V.; NEVES, B. P.; RODRIGUES, C.; SAMPAIO, F. M. T. Intervalo de corte na produção de massa seca e composição químico-bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. MG-5. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1197-1202, jul./ago., 2007.

DENIUM, B. The influence of physical factors on the natural content of forages. **Medelingen Landouwhogeschool**, v. 81, p. 1-18, 1981.

DIAS, F. J.; JOBIM, C. C.; BRANCO, A. F.; OLIVEIRA, C. A. L. Efeito de fontes de fósforo sobre a digestibilidade “*in vitro*” da matéria seca, da matéria orgânica e nutrientes digestíveis totais do capim-mombaça (*Panicum maximum* Jacq. Cv. Mombaça). **Ciências Agrárias**, v. 29, n.1, p. 211-220, 2008.

DIXON, R. A.; CHEN, F.; GUO, D. J.; PARVATHI, K. The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? **Phytochemistry**, v. 57, p. 1069-1084, 2001.

DWIVEDI, U. N.; CAMPBELL, W. H.; YU, J.; DATLA, R. S. S.; BUGOS, R. C.; CHIANG, V. L.; PODILA, G. K. Modification of lignin biosynthesis in transgenic *Nicotiana* through expression of an antisense O-methyltransferase gene from *Populus*. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 61-71, 1994.

EUCLIDES, V. P. B. **Produção animal em sistema intensivo combinado de pastagens tanzânia e braquiárias na região dos Cerrados**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 2001. 13 p. EMBRAPA Programa Produção Animal - Subprojeto 06.0.99.188.01.

EUCLIDES, V. P. B. Valor alimentício de espécies forrageiras do gênero *Panicum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 12, Piracicaba, 1995. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1995. p. 245-274.

EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M.; ZIMMER, A. H.; JANK, L.; OLIVEIRA, M. P. Avaliação dos capins mombaça e massai sob pastejo. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 37, n. 1, p. 18-26, 2008.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP). O mapa da árvore do papel. **Pesquisa FAPESP**, v. 73, 2002.

FRANÇA, A. F. S.; BORJAS, A. L. R.; OLIVEIRA, E. R. ; SOARES, T. V.; MIYAGI, E. S.; SOUZA, V. R. Parâmetros nutricionais do capim tanzânia sob doses crescentes de nitrogênio em diferentes idades de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 695-703, out./dez. 2007.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 3713-3720, 2004.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fiber analysis: apparatus reagents, procedures and some applications. **Agricultural Handbook**, v. 379, 1970.

GRABBER, J. H.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, p. 193-200, 1998.

GRABBER, J. H.; RALPH, J.; HATFIELD, R. D. Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 6106-6113, 2000.

GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignin genetic engineering revisited. **Plant Science**, v. 145, p. 51-65, 1999.

GUO, D. J.; CHEN, F.; INOUE, K.; BLOUNT, J.; DIXON, R. Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coa 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. **Plant Cell**, v. 13, p. 73-88, 2001.

HACK, E. **Variações estruturais e produção de leite na pastagem de capim-mombaça**. 2004. 48 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

HACKER, J. B.; MINSON, D. J. The digestibility of plant parts: review article. **Herbage Abstracts**, v. 51, p. 459-482, 1981.

HERLING, V. R.; BRAGA, G. J.; LUZ, P. H. C.; OTANI, L. Tobiatã, tanzânia e mombaça. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 17, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 89-132.

HERRERA, R.S. Stem and leaf contribution to the chemical composition of cynodon dactylon cv. coast cross 1. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 13, p. 307-314, 1979.

HU, W. J.; KAWAOKA, A.; TSAI, C. J.; LUNG, J.; OSAKABE, K.; EBINUMA, H.; CHIANG, V. L. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 5407-5412, 1998.

HUMPHREYS, J. M.; CHAPPLE, C. Rewriting the lignin roadmap. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 224-229, 2002.

JOUANIN, L.; GOUJON, T.; DE NADAI, V.; MARTIN, M. T.; MILA, I.; VALLET, C.; POLLET, B.; YOSHINAGA, A.; CHABBERT, B.; PETIT-CONIL, M. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. **Plant Physiology**. v. 123, p. 1363-1373, 2000.

JUNG, H.G.; CASLER, M. D. Maize stem tissues: cell wall concentration and composition during development. **Crop Science**, v. 46, p. 1793-1800, 2006.

JUNG, H. J. G.; NI, W. T. Lignification of plant cell walls: impact of genetic manipulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 12742-12743, 1998.

LAPIERRE, C.; POLLET, B.; PETIT CONIL, M.; TOVAL, G.; ROMERO, J.; PILATE, G.; LEPLÉ, J. C.; BOERJAN, W.; FERRET, V.; DE NADAI, V. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. **Plant Physiology**. v. 119, p. 153-163, 1999.

LI, Y.; NAKAZONO, M.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A. Molecular and cellular characterizations of a cDNA clone encoding a novel isozyme of aldehyde dehydrogenase from rice. **Gene**, v. 249, p. 67-74, 2000.

MATTOS, W. Alimentos para ruminantes: noções básicas e valor nutritivo. In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. Curso de alimentação de bovinos. Piracicaba: **FEALQ**, 1992. p. 53-69.

MECHIN, V.; ARGILLIER, O.; MENANTEAU, V.; BARRIÈRE, Y.; MILA, I.; POLLET, B.; LAPIERRE, C. Relationship of cell wall composition to *in vitro* cell wall digestibility of maize inbred line stems. **Jour. Sci. Food and Agricult.**, v. 80, p. 574-580, 2000.

MELLO, A. C. L. **Respostas morfofisiológicas do capim Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. Tanzânia) irrigado à intensidade de desfolha sob lotação rotacionada**. 2002. 82 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: FAHEY, G. C. Jr. et al. (Ed.). Forage quality, evaluation and utilization. Madison: **American Society of Agronomy**, 1994. p. 450-492.

MORENO, L. S. B. **Produção de forragem de capins do gênero *Panicum* e modelagem de respostas produtivas e morfofisiológicas em função de variáveis climáticas**. 2004. 86 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

NAIR, R. B.; BASTRESS, K. L.; RUEGGER, M. O.; DENAULT, J. W.; CHAPPLE, C. The *Arabidopsis thaliana* reduced epidermal fluorescence gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. **Plant Cell**, v. 16, p. 544-54, 2004.

NI, W.; PAIVA, N. L.; DIXON, R. A. Reduced lignin in transgenic plants containing a caffeic acid O-methyltransferase antisense gene. **Transgenic Research**. v. 3, p. 120-126, 1994.

PACIULLO, D. S. C.; GOMIDE, J. A.; QUEIROZ, D. S.; SILVA, E. A. M. Composição química e digestibilidade *in vitro* de lâminas foliares e colmos de gramíneas forrageiras, em função do nível de inserção do perfilho, da idade e estação de crescimento. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 30, n. 3, p. 964-974, 2001.

PEDERSEN, J. F.; VOGEL, K. P.; FUNNELL, D. L. Impact of reduced lignin on plant fitness. **Crop Science Society of America**, v. 45, p. 812-819, 2005.

PIQUEMAL, J.; CHAMAYOU, S.; NADAUD, I. et al. Down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase erase in maize revisited using a transgenic approach. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1675-1685, 2002.

QUADROS, D. G.; RODRIGUES, L. R. A.; FAVORETTO, V.; MALHEIROS, E. B.; HERLING, V. R.; RAMOS, A. K. B. Componentes da produção de forragem em pastagens dos capins tanzânia e mombaça adubadas com quatro doses de NPK. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 31, n. 3, p. 1333-1342, 2002.

QUEIROZ FILHO, J. L.; SILVA, D. S.; NASCIMENTO, I. S. Produção de matéria seca e qualidade do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) cultivar roxo em diferentes idades de corte. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 29, n. 1, p. 69-74, 2000.

RAMOS, R. L. B.; TOVAR, F. J.; JUNQUEIRA, R. M.; LINO, F. B.; SACHETTO-MARTINS, G. Sugarcane expressed sequences tags (Ests) encoding enzymes involved in lignin biosynthesis pathways. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 235-241, 2001.

RÊGO, F. C. A. **Avaliação da qualidade, densidade e características morfológicas do capim-tanzânia (*Panicum maximum* Jacq cv tanzânia-1) manejado em diferentes alturas, sob pastejo**. 2001. 90 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2001.

RÊGO, F.C.A.; CECATO, U.; DAMASCENO, J.C. Valor nutritivo do capim-tanzânia (*Panicum maximum* Jacq cv tanzânia-1) manejado em alturas de pastejo. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 25, n. 2, p. 363-370, 2003.

REIS, R. A. ; RODRIGUES, L. R. A. Valor nutritivo de plantas forrageiras. Jaboticabal: **FCAVJ-UNESP/FUNEP**, 1993. 26 p.

RODRIGUES, A. L. P.; SAMPAIO, I. B. M.; CARNEIRO, J. C.; TOMICH, T. R.; MARTINS, R. G. R. Degradabilidade *in situ* da matéria seca de forrageiras tropicais obtidas em diferentes épocas de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 658-664, 2004.

RODRIGUES, L. R. A. Espécies forrageiras para pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 8., 1986, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, p. 375-387, 1986.

SANTOS, P. M.; BALSALOBRE, M. A. A.; CORSI, M. Efeito da frequência de pastejo e da época do ano sobre a produção e a qualidade em *Panicum maximum* cvs. tanzânia e mombaça. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 28, p. 244-249, 1999.

SANTOS, P. M.; BALSALOBRE, M. A. A.; CORSI, M. Morphogenetic characteristics and management tanzânia grass. **Pesq. Agrop. Bras.**, v. 38, n. 8, p. 991-957, 2003

SANTOS, P. M.; BALSALOBRE, M. A. A.; CORSI, M. Características morfogênicas e taxa de acúmulo de forragem do capim-mombaça submetido a três intervalos de pastejo. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 33, p. 843-851, 2004.

SANTOS, P.M. **Controle do desenvolvimento das hastes no capim tanzânia**: um desafio. 2002. 112 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SAS INSTITUTE. Statistical Analysis System: user`s guide. Version 8.2. **Cary: SAS Institute**, USA, 2000.

SELMAN-HOUSEIN, G.; LOPEZ, M. A.; HERNANDEZ, D.; CIVARDI, L.; MIRANDA, F.; RIGAU, J.; PUIGDOMENECH, P. Molecular cloning of cdnas coding for three sugarcane enzymes involved in lignification. **Plant Scien.** v. 143, p. 163-171, 1999.

SEWALT, V. J. H.; NI, W. T.; JUNG, H. J. G.; DIXON, R. Lignin impact on fiber degradation: increased enzymatic digestibility of genetically engineered tobacco (*Nicotiana tabacum*) stems reduced in lignin content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1977-1983, 1997.

SKIBBE, D. S.; LIU, F.; WEN, T. J.; YANDEAU, M. D.; CUI, X.; CAO, J.; SIMMONS, C. R.; SCHNABLE, P. S. Characterization of the aldehyde dehydrogenase gene families of *Zea mays* and *Arabidopsis*. **Plant Mololec. Biol.**, v. 48, p. 751-64, 2002.

SOUZA, F. H. D. *Panicum maximum* in Brazil. In: LOCH, D. S.; FERGUSON, J. E. **Forage seed production**: v. 2. - Tropical and subtropical species. New York: CABI, 1999. p. 363-370.

STELL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 633 p.

TAMASSIA, L. F. M.; HADDAD, C. M.; CASTRO, F. G. F.; VENDRAMINI, J. M. B.; DOMINGUES, J. L. Produção e morfologia do capim de Rhodes em seis maturidades. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 3, p. 599-605, jul./set. 2001.

TERRY, R. A.; TILLEY, J. M. A. The digestibility of the leaves and stems of perennial ryegrass, cocksfoot, timothy, tall fescue, Lucerne and sainfoin, as measured by an *in vitro* procedure. **Grass and Forage Science**, v. 19, n. 4, p. 363-372, 1964.

THIAGO, L. R. L. S.; GILL, M. Consumo voluntário de forragem por ruminantes: mecanismo físico ou fisiológico. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 19, p. 47-48, 1990.

TSAL, C. J.; POPKO, J. L.; MIELKE, M. R.; HU, W. J.; PODILA, G. K.; CHIANG, V. L. Suppression of O-methyltransferase gene by homologous sense transgene in quaking aspen causes red-brown wood phenotypes. **Plant Physiology**. v. 117, p. 101-112, 1998.

VAN DOORSSELAERE, J.; BAUCHER, M.; CHOIGNOT, E.; CHABBERT, B.; TOLLIER, M. T.; PETIT-CONIL, M.; LEPLÉ, J. C.; PILATE, G.; CORNU, D.; MONTIES, B. A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid 5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. **The Plant Journal**. v. 8, p. 855-864, 1995.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Corvallis: O & B Books Incorporated, 1982. 170 p.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca, USA: Cornell University Press. 1994. 476 p.

VOGEL, K.P.; JUNG, H. J. G. Genetic modification of herbaceous plants for feed and fuel. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 20, p. 15-49, 2001.

WATTIAUX, M. A.; MERTENS, D. R.; SATTER, L. D. Effect of source and amount of fiber on kinetics of digestion and specific gravity of forage particles in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3872-83, 1991.

WILMAN, D.; MOGHADDAM, P. R. *In vitro* digestibility and neutral detergent fiber and lignin contents of plant parts of nine forage species. **Journal Agricultural Science**, v. 131, p. 51-58, 1998.

WILSON, J. R. Organization of forage plant tissues. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. (Ed). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy : Crop Science Society of America : Soil Science Society of America, 1993. p. 1-32.

WILSON, J.R. Variation of leaf characteristics with level of insertion on a grass tiller. I. Development rate, chemical composition, and dry matter digestibility. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 27, n. 3, p. 343-354, 1976.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F.; STEWART JR., C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 85, p. 1-12, 2006.

ANEXO A - SEQUÊNCIAS DE DNA

As seguintes seqüências de DNA obtidas no experimento foram depositadas no GenBank®:

***Urochloa maxima* cinnamoyl-CoA reductase (CCR) mRNA**

ACCESSION EU741931
 AUTHORS Silva, L.F.P., Stabile, S.S. and Magalhaes, J.D.
 TITLE Identification and sequencing of guineagrass cinnamoyl-CoA reductase (CCR)

ORIGIN

```

1  ctggtactgc tacgggaagc cgtgtggcga gcaggcggcg tgggacgctg ctcgacaacg
61  cggcgtggac cttgttgttg tgaaccctgt gctggtgggt ggcccgctgc tgcaggcaac
121 ggtgaacgcc agcatcgccc acatcctcaa gtacctggac gggtcggccc ggacctacgc
181 caacgcggtg caggcctacg tggacgtccg cgacgtcgcc gccgcgcacc tcgccgtctt
241 cgagagcccc gacgcctccg gccgccacct ctgcgccgag cgcgtcctcc accgcgagga
301 cgtcgtccgt atcctcgcca agctcttccc cgagtacccc gtccccacca ggtgctccga
361 cgagaagaat ccgaggaagc aggagtacaa gatg
```

***Urochloa maxima* cinnamate 4-hydroxylase (C4H) mRNA**

ACCESSION EU741932
 AUTHORS Silva, L.F.P., Stabile, S.S. and Magalhaes, J.D.
 TITLE Identification and sequencing of guineagrass cinnamate 4-hydroxylase (C4H)

ORIGIN

```

1  tcgcagagct tcgagtacaa ctacggcgac ttcatccccg tcctccgcc attcctccgt
61  gggtagctca acagatgccg cgacctcaag acccgccgca tgaaggtctt cgaggacaac
121 ttcgtccagg agcgcaagaa ggtgatggcc cagactggcg agatccggtg cgccatggac
181 cacatcctcg aggccgagag gaaggcgag atcaaccacg acaacgtcct
```

***Urochloa maxima* 4-coumarate coenzyme A ligase (4CL) mRNA**

ACCESSION EU741933
 AUTHORS Silva, L.F.P., Stabile, S.S. and Magalhaes, J.D.
 TITLE Identification and sequencing of guineagrass 4-coumarate coenzyme A ligase (4CL)

ORIGIN

```

1  ggctggctgc acaccggaga cattggctac gttgacgacg acgacgagat cttcatcgct
61  gacaggctca aggagatcat caagtataag gggttccagg tgccgcctgc agagcttgag
121 gccctcctca tcacgcaccc ggagatcaag gacgccgccc tcgtatcaat gaaggatgat
181 cttgccggtg aaatccccgt cgccttcata gtgcggacag aagggtctga actcaccgag
241 gatgcgatca agcaatttgt tgccaaggag gtggttttct acaagaagat ccacaa
```

***Urochloa maxima* phenylalanine ammonia-lyase (PAL) mRNA**

ACCESSION EU741934
 AUTHORS Silva, L.F.P., Stabile, S.S. and Magalhaes, J.D.
 TITLE Identification and sequencing of guineagrass phenylalanine ammonia-lyase (PAL)

ORIGIN

```

1  aggtcaaadc cgtgaacgac aaccgctca ttgacgtctc ccgtggcaag gcgctccacg
61  gtggcaactt ccagggcacc cccatcggtg tctccatgga caacaccgc ctcgccctcg
121 ccgccatcgg caagctcatg ttcgcgcagt tctccgagct ggtgaacgac ttctacaaca
181 atggcctgcc ctccaacctt tctggtggac gcaacccag cttggactac gggttcaagg
241 gtgctgagat cgccatggca tctactgct ctgagctcca gttcctcggc aaccagtgta
301 ccaaccacgt gcagagcgct gagcagcaca accaggacgt gaaactc
```

Urochloa maxima caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoAOMT) mRNA

ACCESSION EU741935

AUTHORS Silva,L.F.P., Stabile,S.S. and Magalhaes,J.D.

TITLE Identification and sequencing of guineagrass caffeoyl-CoA
O-methyltransferase (CCoAOMT)

ORIGIN

```
1 aagagcgacg acctgtacca gtacatcctt gacaccagcg tgtacccgcg agagccggag
61 agcatgaagg agttgcgcga ggtcaccgcc aagcacccat ggaacctgat gacgacgtcg
121 gccgacgagg gccagttcct caacatgctc atcaagctca tcggcgccaa gaagaccatg
181 gagatcggcg tctacaccgg ctactccctc c
```