**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

LUÍS FELIPE PRADA E SILVA

**MATURIDADE E LIGNIFICAÇÃO EM GRAMÍNEAS TROPICAIS
UTILIZADAS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES**

Tese apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de professor Livre-Docente junto ao Departamento de Nutrição e Produção Animal na disciplina de Forragens Conservadas.

Pirassununga, SP

2009

17 22411

Nº CLASSIFICAÇÃO
T. 2120
FMVZ
Nº TOMBO
028938

SAB 1955

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.2120
FMVZ

Silva, Luís Felipe Prada e
Maturidade e lignificação em gramíneas tropicais, utilizadas na
alimentação de ruminantes / Luís Felipe Prada e Silva. – Pirassununga :
L. F. P. Silva, 2009.
144 f. : il.

Tese (livre-docência) - Universidade de São Paulo. Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e
Produção Animal, 2009.

1. Digestibilidade. 2. Expressão gênica. 3. Fibras. 4. Lignina.
5. *Panicum Maximum*. 6. *Zea mays*. 7. *Sacharum spp.* I. Título.

Dedico

*Aos meus filhos, Marina e Bernardo,
pela alegria de viver.*

Ofereço

*À Andréa Maria Silveira e Silva,
pelo amor e inspiração constantes.*

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP pela motivação e apoio à obtenção da livre-docência.

As parceiras de trabalho nestes experimentos e muitos outros vindouros, Dra. Liana Jank, Dra. Maria Elisa A. G. Zagatto Paterniani e Dra. Maria Lúcia Pereira Lima.

Ao Dr. Luiz Lehmann Coutinho pela amizade, ensinamentos e colaboração no seqüenciamento de DNA.

Ao Dr. Flávio Vieira Meirelles pela amizade e colaboração com a amplificação por PCR em tempo real.

À equipe do laboratório de genômica funcional, Aline, Samuel, Diego, Marina, Juliane, Daniela, Rafael, Ana Paula, Natalia, Gabriela e Larissa, pelo auxílio direto na condução das pesquisas.

A FAPESP e ao CNPq, pelo financiamento das pesquisas.

A todos os que me apoiaram, e desejaram que eu atingisse o meu objetivo,

“MUITO OBRIGADO!!”

SUMÁRIO

Capítulo 1

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	11
1.1	HIPÓTESES	14
1.2	OBJETIVOS	14
1.3	REFERÊNCIAS	15

Capítulo 2 - Revisão da literatura pertinente

2	GRAMÍNEAS TROPICAIS UTILIZADAS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES	18
2.1	<i>PANICUM MAXIMUM</i> JACQ.....	18
2.2	PLANTA DE MILHO (<i>ZEA MAYS</i> L.)	20
2.3	CANA-DE-AÇÚCAR (<i>SACCHARUM</i> SPP.)	22
2.4	QUALIDADE DE FORRAGEM E DESEMPENHO ANIMAL	24
2.5	MATURIDADE E LIGNIFICAÇÃO.....	26
2.5.1	Efeito da maturidade sobre a qualidade nutricional de <i>Panicum maximum</i>	26
2.5.2	Efeito da maturidade sobre a qualidade nutricional do milho para ensilagem	28
2.5.3	Efeito da maturidade sobre a qualidade nutricional de cana-de-açúcar.....	31
2.5.4	Biossíntese de lignina	32
2.6	REFERÊNCIAS	37

Capítulo 3 - Características de produção e qualidade nutricional de genótipos de *Panicum maximum* colhidos em três estádios de maturidade

RESUMO	50
ABSTRACT	51
3.1 INTRODUÇÃO	52
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.4 CONCLUSÕES.....	67
3.5 REFERÊNCIAS.....	68

Capítulo 4 - Variação genética da composição química e digestibilidade do colmo de genótipos de milho colhidos em três estádios de maturidade

RESUMO72

ABSTRACT73

4.1 INTRODUÇÃO74

4.2 MATERIAL E MÉTODOS75

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO77

4.4 CONCLUSÕES.....95

4.5 REFERÊNCIAS.....96

Capítulo 5 - Composição bromatológica e digestibilidade de genótipos de cana-de-açúcar colhidos em duas épocas do ano

RESUMO101

ABSTRACT102

5.1 INTRODUÇÃO103

5.2 MATERIAL E MÉTODOS104

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO105

5.4 CONCLUSÃO111

5.5 REFERÊNCIAS.....112

Capítulo 6 - Prospecção de genes relacionados com a digestibilidade da parede celular de *Panicum maximum*

RESUMO115

ABSTRACT116

6.1 INTRODUÇÃO117

6.2 MATERIAL E MÉTODOS118

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO125

6.4 CONCLUSÕES.....134

6.5 REFERÊNCIAS.....135

Capítulo 7 -Considerações Finais

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS139

ANEXOS142

RESUMO

SILVA, L. F. P. **Maturidade e lignificação em gramíneas tropicais utilizadas na alimentação de ruminantes.** [Maturity and lignification in tropical grasses used for ruminant nutrition]. 2009. 144 f. Tese (Livre-docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

A lignificação da parede celular que ocorre com o avanço da maturidade em forragens tropicais, é grande limitante à produtividade da pecuária brasileira. Apesar da importância das pastagens para a produção de ruminantes no Brasil, não existe nenhum estudo publicado envolvendo a alteração da síntese de lignina em forrageiras tropicais. Objetivou-se com o presente estudo: (1) avaliar o efeito da maturidade sobre a qualidade nutricional de três gramíneas tropicais, *Panicum maximum*, milho e cana-de-açúcar, (2) determinar a existência de variabilidade genética para parâmetros de qualidade nutricional, e (3) sequenciar e quantificar a expressão dos principais genes envolvidos com a síntese de lignina em *P. maximum*, de modo a identificar genes cuja expressão esteja relacionada com a lignificação e com a queda da digestibilidade da fibra do colmo. No experimento 1, onze genótipos de *P. maximum* foram avaliados em delineamento de blocos ao acaso, em esquema de parcela subdividida, com três repetições, colhidos com 30, 60 ou 90 dias. 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. Entretanto, a fração colmo apresentou maior digestibilidade da MS com 60 dias de crescimento e maior digestibilidade da FDN (DIVFDN) com 30 e 60 dias de crescimento. Os resultados sugerem que, principalmente para sistemas intensivos de exploração do *P. maximum*, a digestibilidade da fração colmo tem grande validade como medida de qualidade da planta. No experimento 2, quinze híbridos de milho foram avaliados em ensaio sob delineamento de blocos ao acaso, com três repetições, colhidos com 90, 120 e 150 dias após a germinação. O 4º e 5º internódios do colmo, acima do solo, foram retirados para determinação da composição bromatológica e digestibilidade *in vitro*. Houve queda no teor de fibra e aumento na concentração de lignina com avanço da maturidade, em ambos os internódios. Houve aumento na digestibilidade da MS do 5º internódio com o avanço da maturidade, enquanto que não houve efeito sobre o 4º internódio. Ocorreu redução na digestibilidade da fibra do 4º internódio com o avanço da maturidade, enquanto que não houve efeito sobre o 5º internódio. A digestibilidade da fibra do 4º internódio foi negativamente correlacionada com a lignificação, enquanto que esta correlação foi inexistente no 5º internódio, indicando que o 4º internódio do colmo pode ser

utilizado como indicador da queda de digestibilidade da fibra do colmo de híbridos de milho que ocorre com o avanço da maturidade. No experimento 3, nove genótipos de cana-de-açúcar foram colhidos em maio e setembro de 2006, em delineamento inteiramente ao acaso sem repetição de parcelas, por isso não se objetivou a classificação dos genótipos, mas sim a determinação do efeito da maturidade e a existência de variabilidade genética. Em maio, somente a fração planta inteira foi analisada, em setembro foram separados em colmos, folhas ou planta inteira para determinação da composição bromatológica e digestibilidade *in vitro*. Colmos apresentaram menor teor de fibra em detergente neutro (FDN) e lignina (LIG), e maior digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) do que folhas. Em contrapartida, apresentaram menor DIVFDN, maior concentração de LIG e menor concentração de proteína bruta (PB) do que folhas. Houve redução no teor e digestibilidade da FDN com o avanço da maturidade, enquanto que DIVMS, POL e lignina aumentaram. A DIVMS se mostrou negativamente correlacionada com FDN e FDN/POL, porém não houve correlação entre DIVFDN e FDN ou FDN/POL. Conclui-se que o avanço da maturidade promove redução na DIVFDN e aumento na DIVMS, não existindo correlação genética entre acúmulo de açúcar e digestibilidade *in vitro* da fibra. No experimento 4, dos 11 genótipos de *P. maximum* utilizados no experimento 1, foram selecionados os 6 genótipos mais divergentes quanto ao efeito da maturidade sobre a DIVFDN do colmo para estudo de expressão gênica de enzimas da via da lignificação. Estes genótipos foram separados em dois grupos: RÁPIDA ou LENTA queda da digestibilidade do colmo com o avanço da maturidade. O sequenciamento de fragmentos amplificados por PCR demonstrou alta similaridade (89,5%) entre *P. maximum*, milho e arroz. A quantificação da expressão de 6 genes por PCR em tempo real identificou interação grupo x idade significativa para os genes COMT e C4H, e a decomposição da interação identificou o gene PAL como diferencialmente expresso. A expressão destes três genes aumentou ao longo do desenvolvimento somente no grupo RÁPIDA, sem sofrer alteração de expressão no grupo LENTA, posicionando-os como possíveis moduladores da DIVFDN em *P. maximum*. Conclui-se que existe grande variabilidade genética quanto ao efeito de maturidade sobre a digestibilidade do colmo, porém não da folha. A DIVFDN do colmo poderia ser utilizada como parâmetro de seleção em programas de melhoramento de gramíneas tropicais. A expressão dos genes COMT, C4H e PAL se mostrou correlacionada com o declínio da DIVFDN do colmo de *P. maximum* ao longo do desenvolvimento.

Palavras-chave: Digestibilidade. Expressão gênica. Fibra. Lignina. *Panicum Maximum*. *Zea mays*. *Sacharum spp.*

ABSTRACT

SILVA, L. F. P. **Maturity and lignification in tropical grasses used for ruminant nutrition** [Maturidade e lignificação em gramíneas tropicais utilizadas na alimentação de ruminantes] 2009. 144 f. Tese (Livre-docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

The cell wall lignification resultant from the advance in maturity is an important limitation of productivity for the Brazilian cattle industry. Despite the undeniable importance of forages to ruminant production in Brazil, there is no published study with altered lignin synthesis in tropical forages. The objective with this study was to: (1) evaluate the effect of maturity over the nutritional quality of three tropical grasses, *Panicum maximum*, maize and sugarcane, (2) to determine the existing genetic variability on parameters of nutritional quality, and (3) to sequence and to quantify the expression of the main genes related with lignin biosynthesis in *P. maximum*, aiming to identify genes whose expression are related with lignifications and with the decline of stem fiber digestibility. In experiment 1, eleven *P. maximum* genotypes were evaluated in a randomized block design with split-plot, with three replications, harvested at 30, 60 and 90 days of regrowth. There was no variation among genotypes for chemical composition or digestibility for the leaf fraction; however, there was large variability for the chemical composition and digestibility of the stem fraction. The stem fraction had higher NDF, ADF and lignin content, and lower CP values. However, the stem fraction had higher DM digestibility with 60 days of regrowth, and higher NDF digestibility (IVNDFD) with 30 and 60 days of regrowth. The results suggest that, especially for intensive grazing systems using *P. maximum*, the stem digestibility has great value as a measure of plant quality. In experiment 2, fifteen corn hybrids were evaluated in a random block design with three repetitions, harvested with 90, 120 and 150 days after germination. The 4th and 5th above soil stalk internodes were removed for determination of chemical composition and *in vitro* digestibility. The fiber content decreased and lignin content increased with advanced maturity, in both internodes. The DM digestibility of the 5th internode increased with maturity, while there was no change in the 4th internode. The fiber digestibility of the 4th internode was reduced with advanced maturity, while there was no effect on the 5th internode. Fiber digestibility of the 4th internode was negatively correlated with lignification, while this correlation was inexistent for the 5th internode, indicating that the 4th internode could be used as an indicator of the decrease in stalk fiber digestibility that occurs with advanced maturity of corn hybrids. In experiment 3, nine sugarcane genotypes were harvested in May and in

September of 2006, in a completely randomized design, without plot repetition, and therefore it was not the objective to classify the genotypes but only to determine the effect of maturity and the existence of genetic variability. In May, only the whole-plant fraction was analyzed, in September the genotypes were separated in stems, leaves or whole-plant for determination of chemical composition, and in vitro digestibility. Stems had lower contents of NDF and lignin (LIG), and greater in vitro dry matter digestibility (IVDMD) than leaves. However, stems had lower in vitro NDF digestibility (IVNDFD), higher LIG content and lower crude protein (CP) than leaves. The NDF and IVNDFD were reduced with advanced maturity, while IVDMD, POL and lignin were increased. IVDMD was negatively correlated with NDF and NDF/POL, however there was no correlation between IVNDFD and NDF or NDF/POL. It can be concluded that with the advance in maturity the IVNDFD was reduced and IVDMD was increased, and there was no genetic correlation between accumulation of sugar and in vitro fiber digestibility. In experiment 4, from the 11 *P. maximum* genotypes evaluated in experiment 1, the six most divergent for the effect of maturity on stem IVNDFD were selected to study expression of genes in the lignin biosynthesis pathway. These genotypes were separated in two groups: FAST and SLOW decline in stem digestibility with advance in maturity. Sequencing of PCR amplified DNA fragments demonstrated high similarity among *P. maximum*, corn and rice. The quantification of the expression of six genes by Real-time PCR identified a significant group x age interaction for the genes COMT and C4H, and the decomposition of the interaction identified the gene PAL as differentially expressed between the two groups. The expression of these three genes increased throughout development only in the FAST group, without alteration in the SLOW group, what position these genes as possible modulators of IVNDFD in *P. maximum*. We conclude that there is great genetic variability for the effect of maturity over stem digestibility, however not for leaf digestibility. Stem IVNDFD could be used as selection parameter in breeding programs in tropical forages. The expression of the genes COMT, C4H and PAL was correlated with the decline in stem IVNDFD in *P. maximum* throughout development.

Keywords: Digestibility. Fiber. Gene expression. Lignin. *Panicum maximum*. *Zea mays*. *Sacharum spp.*

Capítulo 1 - Introdução e justificativa

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).

As forrageiras tropicais possuem elevada produção de massa em condições de alta temperatura, devido ao processo fotossintético do tipo C_4 , com temperaturas ótimas ao redor de 35 a 38°C (LONG, 1999). Essa adaptação anatômica às altas temperaturas garante às forrageiras tropicais maior eficiência do uso da água e do nitrogênio, maior tolerância à seca, maiores taxas de fotossíntese e, conseqüentemente, mais velocidade de crescimento do que forrageiras temperadas de ciclo fotossintético C_3 (WEDIN, 2004).

As mesmas diferenças anatômicas que garantem maior produção de massa às forrageiras tropicais, também afetam a qualidade nutricional. A qualidade nutricional de forrageiras tropicais varia tremendamente dependendo da maturidade, razão colmo/folha, valor nutritivo inerente de folhas e colmos e fatores ambientais durante o crescimento. Em comparação com forrageiras temperadas e leguminosas, as gramíneas de ciclo C_4 possuem relativamente maiores proporções de parede celular potencialmente digestível, porém devido à sua composição química e estruturas anatômicas, a taxa de degradação e fermentação ruminal de gramíneas C_4 é relativamente lenta (VAN SOEST, 1994). Forrageiras tropicais possuem proporcionalmente mais tecidos com degradação lenta, como xilema, epiderme e células da bainha vascular, e menos tecidos com degradação rápida como mesófilo e floema (AKIN; BURDICK, 1975). Ainda, devido à concentração da enzima Rubisco nas células da bainha vascular, bem como devido à maior eficiência do aparato fotossintético, as folhas de gramíneas C_4 possuem menor concentração de proteína do que folhas de gramíneas C_3 (MULLAHEY et al., 1992).

Apesar das diferenças notadas acima, é perfeitamente possível a obtenção de níveis elevados de produtividade animal em sistemas de produção animal baseados em forrageiras tropicais, desde que a planta seja colhida ainda na fase juvenil (DA SILVA; NASCIMENTO JR., 2007). A concentração de nutrientes decresce com a maturidade mais rapidamente em forrageiras tropicais do que em forrageiras temperadas de ciclo C_3 (DABO et al., 1987). O

trabalho de Burns et al. (1997) exemplifica a velocidade da queda da qualidade nutricional de forrageiras tropicais com o avanço da maturidade, feno de *Panicum virgatum* colhido no estágio vegetativo levou a ganhos de 1 kg/d, no entanto feno da mesma forrageira colhido 14d mais tarde possuía nutrientes somente para manutenção de animais com baixo requerimento nutricional. A queda da qualidade nutricional com o avanço da maturidade ocorre por dois mecanismos principais: a menor taxa de crescimento de folhas, levando a maior proporção de folhas velhas com menor valor nutricional, e a alongação e lignificação do colmo (DABO et al., 1987).

As resultados com manejo de forrageiras tropicais em sistemas de pastejo intensivo, indicaram que após 95% de interceptação luminosa (IL), ou seja, quando a planta atinge seu índice de área foliar crítico (IAFc), o processo de alongação e maturação do colmo se acelera tremendamente, tanto em espécies mais decumbentes (*Brachiaria brizantha*) quanto em espécies de crescimento mais cespitoso (*Panicum maximum*) (DA SILVA; NASCIMENTO JR., 2007).

Além das forrageiras tropicais, a maturidade também afeta a qualidade nutricional do milho e da cana-de-açúcar, recursos forrageiros comumente utilizados em sistemas de produção de ruminantes. Devido ao acúmulo de carboidratos na forma tanto de amido (milho) como sacarose (cana) que ocorre durante a maturação da planta, normalmente a digestibilidade da matéria seca (DMS) destas espécies se altera muito pouco durante o desenvolvimento, porém a digestibilidade da parede celular (DFDN) decai (SILVA et al., 2008). Ou seja, a maturidade altera a composição química destas plantas, se por um lado o teor de FDN é reduzido, por outro a digestibilidade deste FDN será mais lenta em plantas mais velhas (SILVA et al., 2008).

Portanto, o declínio da qualidade nutricional das plantas forrageiras tropicais de ciclo C4 é um dos maiores limitantes ao desempenho animal nos trópicos, e deve ser foco dos programas de melhoramento genético, bem como de programas visando o desenvolvimento de plantas transgênicas com melhor qualidade nutricional. O processo de lignificação, principalmente do colmo, bem como os mecanismos fisiológicos de controle deste processo devem ser elucidados.

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).

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 à 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 (BAUCHER et al., 2003), e para a produção de álcool celulósico a partir do bagaço da cana-de-açúcar ou outras biomassas (CHEN; DIXON, 2007).

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. 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 (CHEN et al., 2003).

O melhoramento genético é a maneira mais efetiva para aumentar a produtividade e qualidade nutricional de forragens tropicais. As principais forrageiras utilizadas no Brasil, *P. maximum* e *Brachiaria Brizantha* se reproduzem por apomixia e, portanto, o melhoramento genético de espécies apomíticas depende da disponibilidade de plantas altamente sexuais, que são raras na natureza. (SAVIDAN, 1983; NAKAGAWA; HANNA, 1992). Assim, considerando-se a complexidade genética e hábito de reprodução apomítico das forragens tropicais, que dificultam tremendamente o avanço através do melhoramento convencional, a biotecnologia oferece uma alternativa importante para obtenção de cultivares produtivos e com maior digestibilidade da parede celular.

Com isso, a proposta com esta tese é estudar o efeito da maturidade sobre a qualidade nutricional de forrageiras tropicais, bem como identificar sequenciar e quantificar a expressão de enzimas da via da lignificação de maneira a identificar os genes cujas expressões estão correlacionadas com o acúmulo de lignina e queda da digestibilidade ruminal da parede celular. O objetivo geral com este trabalho é o de fornecer conhecimento básico sobre o processo de lignificação em plantas forrageiras tropicais de modo a permitir o desenvolvimento da pesquisa visando à modificação da síntese de lignina e melhora na digestibilidade ruminal de forrageiras.

1.1 HIPÓTESES

A hipótese é de que existe variabilidade genética do efeito da maturidade sobre a qualidade nutricional do colmo de gramíneas tropicais, e que a maturidade afeta negativamente a qualidade do mesmo.

Hipotetizamos ainda que a variabilidade genética existente está associada com perfis de expressão diferentes dos genes da via de síntese de monolignóis, componentes da lignina.

1.2 OBJETIVOS

Objetivou-se avaliar o efeito da idade de corte sobre a qualidade nutricional do colmo de genótipos de *Panicum maximum*, milho e cana-de-açúcar, com o intuito de definir critérios de seleção que visem o aumento da digestibilidade da fibra. Objetivou-se ainda a classificação dos genótipos de *P. maximum* e de milho de acordo com suas características produtivas e de qualidade nutricional.

Por fim, objetivou-se identificar e seqüenciar os principais genes envolvidos com a biossíntese da lignina: fenilalanina amônio liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H), 4-cumarato CoA ligase (4CL), cianamil CoA redutase (CCR), cianamoil álcool desidrogenase (CAD) e ácido caféico O-metiltransferase (COMT), e estudar o padrão de expressão destes genes visando a identificação de genes mais fortemente correlacionados com o acúmulo de lignina e queda da digestibilidade ruminal dos tecidos em *P. maximum*.

1.3 REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL 2004. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP, 2004.
- AKIN, D. E.; BURDICK, D. Percentage of tissue types in tropical and temperate grass leaf blades and degradation of tissues by rumen microorganisms. **Crop Science**, v. 15, p. 661-668, 1975.
- ANUALPEC: anuário estatístico da produção animal. São Paulo: FNP, 2004.
- BAUCHER, M.; CHABBERT, B.; PILATE, G.; VAN DOORSSELAERE, J.; TOLLIER, M. T.; PETIT-CONIL, M.; CORNU, D.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W. Red xylem and higher lignin extractability by down-regulation of a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. **Plant Physiology**, v. 112, n. 4, p. 1479-1490, 1996.
- BURNS, J. C.; POND, K. R.; FISHER, D. S.; LUGINBUHL, J. M. Changes in forages quality, ingestive mastication and digesta kinetics resulting from switchgrass maturity. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1368-1379, 1997.
- CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 759-761, 2007.
- 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.
- DABO, S. M.; TALIAFERRO, C. M.; COLEMAN, S. W.; HORN, F. P.; CLAYPOOL, P. L. Yield and digestibility of old world bluestem grasses as affected by cultivar, plant part, and maturity. **J. Range Manage**, v. 40, p.10-15, 1987.
- 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.
- LONG, S. P. Environmental responses. In: SAGE, R. F.; MONSON, R. K.(Ed.). **C4 plant biology**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 215-249.
- MULLAHEY, J. J.; WALLER, S. S.; MOORE, K. J.; MOSER, L. E.; KLOPFENSTEIN, T. J. In situ ruminal protein degradation of switchgrass and smooth brome grass. **Agronomy Journal**, v. 84, p.183- 188, 1992.

NAKAGAWA, H.; HANNA, W. W. Induced sexual tetraploids for breeding guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). **J Jpn Grassl Sci**, v. 38, p. 152–159, 1992.

SAVIDAN, Y. H. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guinea-grass (*Panicum maximum* Jacq.). In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 14., 1983. **Proceedings...** p. 182–184.

SILVA, L. F. P.; CASSOLI, L. D; ROMA JUNIOR, L. C; RODRIGUES, A. C. O.; MACHADO, P. F. In situ degradability of corn stover and elephant-grass harvested at four stages of maturity. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 595-603, 2008.

SILVA, S. C. da; NASCIMENTO JR., D. Avanços na pesquisa com plantas forrageiras tropicais em pastagens: características morfofisiológicas e manejo do pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science**, v. 36, p. 121-149, 2007

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

WEDIN, D. C₄ grasses: resource use, ecology, and global change. Pages 15–50 in LW Moser. In: BURSON, B. L.; SOLLENBERGER, L. E. (Ed.). **Warm-season (C₄) grasses**. Madison, WI: American Society of Agronomy, 2004.

Capítulo 2 - Revisão da literatura pertinente

2 GRAMÍNEAS TROPICAIS UTILIZADAS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES

2.1 *PANICUM MAXIMUM* JACQ

A forrageira pertence à ordem Cyperales (sinônimo Poales), à família Poaceae, gênero *Panicum*, espécie *Panicum maximum* Jacq. Recentemente, esta gramínea foi reclassificada taxonomicamente como *Urochloa máxima* R.D. Webster (ZULOAGA et al., 2000; GIUSSANI et al., 2001; ALISCIONI et al., 2003), seguindo conceito anterior de Webster (1987). Porém ainda é largamente conhecida como *Panicum maximum* e esta será a classificação adotada por este documento. 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 et al., 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. A cultivar Tanzânia, por exemplo, produziu 33 t/ha/ano de matéria seca total, sendo 26 t/ha/ano de matéria seca foliar (80%) (JANK, 1994). 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 (JANK, 1994). No entanto este potencial nem sempre tem sido convertido em produção animal (SANTOS, 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 a 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.

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 (SANTOS, 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.

Uma das alternativas para se contornar o problema da estacionalidade da produção de forrageiras tropicais, é a conservação do excedente de verão na forma de silagem ou de feno. Ou ainda, a destinação de campos exclusivos para a produção de forragens conservadas. A espécie *P. maximum* tem sido amplamente utilizada na forma de silagem por sistemas intensivos de produção de ruminantes, principalmente devido a sua alta produtividade aliada à boa qualidade nutricional (LOURES et al., 2005; TAVARES et al., 2009). No entanto, a rápida queda da qualidade nutricional do capim *P. maximum* com o avanço da maturidade, bem como o elevado teor de umidade e baixo teor de carboidratos solúveis quando colhido muito jovem, apresentam aspectos contrastantes para a utilização do mesmo na forma de silagem (EUCLIDES et al., 1993; BALSALOBRE et al., 2001).

2.2 PLANTA DE MILHO (*ZEAMAYS* L.)

Atualmente a demanda mundial de alimentos é muito grande, tanto para alimentação humana quanto animal, e por tal motivo, a produção de cereais vem crescendo no Brasil, que também possui o maior rebanho comercial do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2007). Um dos cereais mais utilizados na alimentação animal é o milho, sendo o Brasil o 3º produtor mundial, com 58,6 milhões de toneladas ao ano, das quais 44,5 milhões de toneladas são utilizados para o consumo interno e cerca de 75% a 80% destas são consumidas em forma de ração animal (IBGE, 2008).

Pertencente à ordem Cyperales (sinônimo de Poales), família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Maydeae, gênero *Zea*, espécie *Zea mays* L., atualmente o milho é adaptado e cultivado nas mais diversas condições ambientais, por ser uma planta cuja fotossíntese se realiza mediante o ciclo do carbono C₄ (BOREM; GIÚDICE, 2004). Devido à estacionalidade de produção das pastagens e à intensificação dos sistemas de produção, o uso de silagens vem crescendo a cada ano, resultando em melhor desempenho dos animais e redução do gasto com concentrados (SILVA et al., 2003). O milho é considerado como planta padrão para ensilagem, pois quase sempre produz alimento de boa qualidade, com perdas reduzidas. No entanto, é fundamental estabelecer o momento ótimo de colheita para que se obtenha uma silagem de boa qualidade (ALVAREZ et al., 2006).

Os sistemas de produção animal atuais exigem alta produtividade, sendo de fundamental importância a relação de preço e qualidade dos insumos; desse modo, a silagem torna-se um dos fatores decisivos para o sucesso, ou não, da produção animal que dela se utiliza. Com isso, não se pode pensar em retorno econômico sem se preocupar com a alta produtividade e qualidade da forragem conservada.

Até recentemente, era comumente aceito que as características de um bom híbrido de milho para silagem eram aquelas de um bom híbrido de milho para grãos, baseado na suposição que o valor nutritivo de uma silagem é predominantemente influenciado pelo teor de grãos (MA et al., 2006). Isto porque trabalhos anteriores mostraram que os grãos de milho são mais digestíveis do que as folhas e hastes da planta, e, sendo assim, aumentando-se a proporção de grãos na MS, aumentar-se-ia a qualidade do volumoso (DAYNARD; HUNTER, 1975; ROTH et al., 1970; SCHMID et al., 1976, SONON et al., 1993). No entanto, diversos trabalhos (DEINUM; BAKKER, 1981; LUNDVALL et al., 1994; COORS, 1996) mostram que o aumento na porcentagem de grãos na matéria seca total pode diminuir a

digestibilidade das outras partes da planta, não se mostrando correlacionada com a digestibilidade total da MS.

Atualmente há o reconhecimento de que critérios de seleção como grãos duros de alta densidade e com rápida taxa de secagem, e hastes fortes, que favorecem a produção de grãos, podem ser indesejáveis para a colheita, fermentação e digestibilidade da silagem de milho. Híbridos de milho para silagem devem maturar mais lentamente com declínio gradual da umidade da planta, ter grãos macios e baixo teor de fibra em detergente neutro (FDN) com alta digestibilidade do FDN (DWYER et al., 1998).

Um dos fatores responsáveis pela difusão do uso da silagem milho pelos fazendeiros é a manutenção do seu valor nutritivo por um elevado período de tempo (HUBER et al., 1965). Ao contrário de outras gramíneas, como o capim-elefante ou *P. maximum*, que apesar do maior potencial para produção de volumoso, perderiam rapidamente o seu valor nutritivo com o avanço da maturidade (DESCHAMPS, 1999).

A manutenção do elevado valor nutritivo da silagem de milho parece ocorrer devido a maior participação dos grãos na matéria seca total, em detrimento da qualidade da porção volumosa (DAYNARD; HUNTER, 1975). Estes autores mostraram que quando o teor de MS do material variou de 33,2 para 39,6%, a digestibilidade *in vivo* da planta toda não se alterou (70%), porém a digestibilidade da porção fibrosa passou de 61,8 para 54,2%. Os autores concluem que a digestibilidade da planta toda não deve ser um fator a ser levado em conta para a escolha do momento de corte.

Resultados semelhantes foram reportados por Gordon et al. (1968) e Johnson e McClure (1968). Neste último, a digestibilidade da celulose passou de 74 para 48% quando o teor de MS passou de 20 para 71%. Sendo assim, torna-se imperioso o estudo do efeito da idade de corte sobre a qualidade da fração volumosa de híbridos de milho, e a sua comparação com a qualidade da forragem oriunda de outras gramíneas com maior potencial para produção de forragem.

De acordo com Miranda et al. (2006), a escolha de cultivares de milho para a produção de silagem é geralmente baseada em parâmetros agrônômicos, como boa arquitetura foliar, alta produção de grãos, alta produção de massa verde, alta relação grãos/massa verde, resistência à pragas e doenças, adaptação às condições climáticas e de fertilidade do solo, resistência ao acamamento, ciclo vegetativo compatível com o manejo da propriedade, além de alto valor nutritivo por unidade de peso de forragem.

Silva et al. (2003), Cruz et al. (2008) e Vilela et al. (2008) observaram a existência de grandes diferenças entre os cultivares de milho atualmente no mercado, sendo que, tendo em

vista à alta qualidade como planta forrageira, é importante e fundamental que se avalie, no momento da escolha da cultivar, o ciclo vegetativo da planta, tipo de endosperma do grão, proporção das frações da planta, valor nutritivo e potencial produtivo. Desta forma, cresce a importância das informações sobre a origem genética dos híbridos, bem como sobre a qualidade dos materiais a serem ensilados (NUSSIO et al., 2001).

A utilização de silagens com alta concentração de parede celular para animais de alta produtividade, normalmente resulta em desempenho limitado, principalmente pela taxa de digestão e passagem da fração fibrosa da dieta pelo rúmen (OBA; ALLEN, 1999; BARRIÈRE et al., 2003). Desta forma, o aumento da digestibilidade da parede celular se tornou o objetivo de vários programas de melhoramento de forragens e híbridos de milho para produção de silagem (GOMES et al., 2004; MASOERO et al., 2006). Híbridos selecionados para melhorar a qualidade forrageira da silagem, resultam na melhora da produção e desempenho animal (CHERNEY et al., 2004). Deste modo, se quisermos desenvolver híbridos mais específicos para ensilagem no futuro, devemos selecionar melhor a digestibilidade da fração fibrosa e do amido dos grãos.

2.3 CANA-DE-AÇÚCAR (*SACCHARUM* SPP.)

A cana-de-açúcar é uma planta alógama, pertence a divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, sub-classe Commelinidae, ordem Cyperales (sinônimo de Poales), família Poaceae, tribo Andropogonae e sub tribo Saccharininae (CASTRO et al., 2001).

O gênero *Saccharum* L., apresenta as seguintes espécies: *S. officinarum* L., *S. spontaneum* L., *S. sinensis* Roxb., *S. barben* Jew., *S. robustum* Jew. e *S. edule* Hask. De todas as espécies citadas são consideradas puras apenas *S. spontaneum* L. e *S. robustum* Jesw., sendo as demais de origem híbrida (CASTRO et al., 2001).

Apesar do menor valor nutritivo em relação às silagens de milho e sorgo (ANDRADE et al., 2004), a cana-de-açúcar apresenta características de grande interesse aos bovinocultores como elevada produção de matéria seca por hectare, facilidade de cultivo e persistência da cultura, boa aceitação pelos animais; elevado teor de carboidratos solúveis e menor custo de produção (FREITAS et al., 2006; LANDELL et al., 2002). Dib Nunes Jr. (1987) relata que no estado de São Paulo é freqüente as usinas obterem rendimentos de 85 t de colmo/ha, o que corresponderia a uma produção de 110 a 120 t/ha de forragem.

Como planta forrageira, uma característica de grande interesse, é que essa planta se armazena naturalmente com pouca queda do seu valor nutritivo, que depende basicamente do seu teor de sacarose (BOIN et al., 1987; SALLAS et al., 1992). Por outro lado, vários autores criticam a cana-de-açúcar por apresentar baixo teor de proteína bruta, baixa degrababilidade da fibra e conseqüentemente, baixo consumo voluntário pelos animais (CARMO et al., 2001; LOPES; AROEIRA, 1999).

Ao contrário de outras forrageiras, a cana não reduz seu valor nutritivo de forma expressiva no período de estiagem, e destaca-se pelo aumento no teor de sacarose nesta época do ano (BORGES; PEREIRA, 2003). O desenvolvimento recente de técnicas de conservação da planta inteira da cana-de-açúcar na forma de silagem permite sua utilização por um número maior de pecuaristas nos mais diversos sistemas de produção (SCHMIDT et al., 2007; QUEIROZ et al., 2008).

É importante conhecer a qualidade da cana, em termos de fibra, conteúdo de açúcares e relação fibra/açúcar. Até pouco tempo atrás, havia a recomendação por variedades que apresentassem alta proporção de folhas e palmitos em relação à massa verde total, o que fazia o ideotipo dessa espécie assemelhar-se às outras forrageiras utilizadas comumente como pastagem (BOIN et al., 1987). Entretanto, de acordo com Rodrigues et al. (2002), os açúcares presentes na cana são os principais responsáveis pelo fornecimento de energia e, por conseqüência, pelo desempenho do animal. Assim, Andrade et al. (2003) recomendam que, com vistas à alimentação animal, devem ser selecionados genótipos de cana-de-açúcar que apresentem alta porcentagem de carboidratos totais não estruturais e baixas porcentagens dos componentes da fibra, associados à alta produção de matéria seca.

Rodrigues et al. (1997) comentaram que variedades que apresentam menor teor de FDN, permitem ao animal maior consumo de energia, do que variedades com teor de açúcar um pouco melhor, porém com maior teor de FDN. Sendo assim, a digestibilidade tem sido utilizada como variável de qualidade, indicando a proporção do alimento que está apta a ser utilizada pelo animal. No entanto, em um trabalho utilizando cana descascada, com maior DIVMS, Preston (1982) não observou melhoria no ganho de peso dos animais, demonstrando que a DIVMS não deve ser considerada isoladamente como parâmetro para escolha de variedades de cana-de-açúcar para a alimentação animal. A taxa de digestão ruminal da FDN da fração colmo é uma característica importante a determinar o valor nutritivo da cana-de-açúcar.

A ocorrência de variações nos parâmetros de qualidade nutricional das forrageiras segundo espécie, variedade, estágio de maturação, parte da planta considerada (colmo ou

folhas), fertilidade do solo, entre outros, já é bastante conhecida e possibilita o emprego do melhoramento genético como ferramenta para a manipulação da qualidade das forragens (CASLER, 2006). No entanto, o melhoramento da cana-de-açúcar tem-se direcionado principalmente para os objetivos industriais de produção de açúcar e álcool combustível, que buscam basicamente maior produção de sacarose por área (AZEVEDO et al., 2003).

Porém, além do teor de sacarose, a qualidade da fibra é de fundamental importância quando a cana-de-açúcar é fornecida à animais ruminantes, evidenciando a necessidade do estabelecimento de critérios de seleção visando especificamente à alimentação animal (FREITAS et al., 2006). A principal limitação para o uso da cana-de-açúcar na nutrição de animais de elevado potencial de produção é a baixa digestibilidade da fibra, aliado ao baixo teor de proteína bruta (PEREIRA et al., 2001).

2.4 QUALIDADE DE FORRAGEM E DESEMPENHO ANIMAL

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 obter 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 et al., 1991). Estudos de alimentação e pastejo demonstram que pequenas mudanças na digestibilidade da forragem têm 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. Ao mesmo tempo, haveria uma redução na emissão de esterco ao meio ambiente e no uso de alimentos concentrados.

O consumo da matéria seca, componente mais importante na nutrição animal, determina o nível de nutrientes ingeridos, e é influenciado por características do animal, alimento e manejo alimentar. A fibra em detergente neutro (FDN), representada pela hemicelulose, celulose, e lignina da parede celular vegetal, está negativamente correlacionada com o consumo de matéria seca, enquanto a fibra em detergente ácido (FDA), correspondendo à celulose e lignina, está negativamente correlacionada com a digestibilidade

de forragens (WATTIAUX, 1999). Normalmente, o consumo de matéria seca correlaciona-se negativamente com o teor de parede celular da planta quando este se situa acima de 55 a 65 % na MS (MERTENS, 1994). Quando a densidade energética da dieta é alta, em relação às exigências do animal, o consumo será limitado pela saciedade metabólica do animal, e não pelo enchimento físico ruminal (MERTENS, 1994).

Apesar de importante, o teor de FDN de uma forragem não é o único fator controlando o consumo e consequentemente o desempenho animal. Segundo o NRC (2001), o consumo de MS depende de forma direta da eficiência do ruminante em processar e utilizar o alimento no ambiente ruminal para produção de energia, sendo dependente diretamente da digestibilidade do alimento.

Dentre os fatores causais determinantes do consumo voluntário está a qualidade da fibra e, conseqüentemente, sua digestibilidade e eficiência com a qual os nutrientes digeridos são utilizados pelo animal. Tais fatores resultam, no entanto, da interação entre características do próprio animal, como sua capacidade gastrointestinal em acomodar fibra insolúvel, por exemplo, bem como de aspectos cinéticos da própria fibra insolúvel contida nos alimentos, quando submetidas às ações de digestão e retenção da matéria fibrosa no rúmen (VIERA et al., 2006). No experimento de Allen et al. (2000), a resposta no consumo de forragens com maior digestibilidade da FDN dependeu tanto de fatores da dieta como do animal, sendo a resposta mais evidente em animais com altas exigências de energia e alimentados com dietas com menor teor de energia.

Mahanna (1994) relatou que pesquisas feitas pela Pioneer dos Estados Unidos encontraram dois híbridos com a mesma produção de silagem, diferindo 15% quanto à digestibilidade da fração volumosa. Quando essas silagens foram oferecidas a bovinos em crescimento, compondo 65 % da dieta, o híbrido mais digestível resultou em uma melhora de 11% na eficiência alimentar e 7 % no ganho de peso médio diário. Cavalcante et al. (2004) avaliaram diferentes níveis de silagem de milho e/ou feno de capim-Tifton 85 em dietas para bovinos, com relação volumoso:concentrado de 60:40 e registraram valores de consumo de matéria seca de 9,2 kg/dia. A substituição do feno de capim-Tifton 85 pela silagem de milho não influenciou o consumo, mas devido à qualidade da fibra da silagem, foi observada melhora na eficiência de utilização dos nutrientes, possibilitando melhores ganhos de peso e produção de leite.

Vários estudos demonstram que a digestibilidade *in vitro* da FDN (DIVFDN) de forragens é extremamente variável, variando de 35,6 a 69,9% para silagens de milho (OBA; ALLEN, 2005). Esta variação é esperada, uma vez que os programas de melhoramento de

forragens não focam neste parâmetro, mantendo grande variabilidade genética na população. O consumo de forragens com maior DIVFDN leva a um aumento na produtividade animal, de maneira que um aumento de 1 unidade na DIVFDN estava associada com um aumento de 0,17 kg/d no consumo de matéria seca (MS), e aumento de 0,25 kg de leite/d corrigido para 4% de gordura (OBA; ALLEN, 1999).

Weiss e Wyatt (2002) observaram a importância da DIVFDN ao compararam silagem de milho feita com híbrido de alta fibra contra silagem de milho feita com híbrido de duplo propósito (alto amido). Apesar da dieta com silagem de alta fibra ter maior teor de FDN de forragem, a produção de leite foi semelhante a de vacas recebendo silagem com alto amido, provavelmente devido a maior DIVFDN da silagem de alta fibra. A utilização de forragens com maior digestibilidade da fibra cria maior flexibilidade na formulação da dieta, especialmente porque custos de concentrado em relação à volumosos são altamente variável.

2.5 MATURIDADE E LIGNIFICAÇÃO

2.5.1 Efeito da maturidade sobre a qualidade nutricional de *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 têm um impacto significativo no desempenho 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). Em uma revisão de grande número de artigos, Minson (1990) concluiu que o consumo de folhas era maior do que o consumo de colmos. Este mesmo autor relatou que colmos de gramíneas imaturas geralmente possuem alta qualidade, talvez com qualidade superior a de folhas na mesma idade. No entanto, os colmos perdem qualidade mais rapidamente do que folhas, principalmente quando as gramíneas se aproximam da maturidade (MINSON, 1990).

A menor digestibilidade de colmos maduros pode ser atribuída a sua anatomia. Lâminas foliares são compostas por várias células de mesófilo com parede celular fina, enquanto colmos são compostos por células do xilema altamente lignificadas, por alta concentração de bainha vascular, e por outras células esclerenquimáticas (NELSON; MOSER, 1994).

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).

Alves de Brito et al. (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 quantos 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 (WILMAN; MOGHADDAM, 1998).

A maior digestibilidade da fração colmo em estádios iniciais de desenvolvimento pode estar relacionada à maior presença de bainha foliar do que haste nesta fração. Wilman &

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 estádios bem jovens de maturidade, relação que se inverte com o desenvolvimento da planta. Alves de Brito et al. (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 humidicola*.

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

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 et al., 2000). Assim, é importante a seleção de novas forrageiras que possuam maior digestibilidade da FDN e que mantenham alta digestibilidade da FDN mesmo em estádios avançados de maturidade.

2.5.2 Efeito da maturidade sobre a qualidade nutricional do milho para ensilagem

O avanço da maturidade da planta afeta a produção de matéria verde (MV), teor de MS e conseqüentemente a qualidade das silagens (JOHNSON et al., 2002). A amplitude de variação nos teores de MS indica a idade de corte, em concordância com as características de cada cultivar, sendo que o estágio de maturação do milho para silagem pode ser determinado

pela interfase entre a porção líquida e sólida do grão, geralmente 2/3 de linha de leite. Desta forma, à medida que o milho atinge a maturidade, a linha de leite desce à parte inferior do grão. De forma geral, a composição e os valores de energia variam quando se colhe em estádios diferentes de maturidade (ROMERO; ARONNA, 2008).

A maturidade tem efeito no valor nutritivo e densidade de compactação do milho (JOHNSON et al., 2002), influenciando fortemente o tipo de fermentação que ocorre no silo. Silagens feitas com alto teor de MS apresentam diminuição na produção de ácido láctico e se estabilizam em pH mais alto que silagens com baixo conteúdo de MS. O alto conteúdo de MS aumenta a concentração de MS solúvel na silagem, resultando em aumento da pressão osmótica e inibindo o crescimento bacteriano. O conteúdo ideal de MS depende do tipo de silo e é influenciada pelo método e o nível de compactação. Assim, o nível recomendado de MS para ensilar a planta de milho deve ser entre 30 a 40 % para silo trincheira, 35 a 50 % para silo torre e 40 a 50% para silo “bag” (WATTIAUX, 1999).

Bal et al. (2006) avaliaram duas variedades de milho, cortados na mesma idade e cultivados de forma semelhante, e observaram diferença na composição química e digestibilidade (36 % e 40 %) concluindo que o corte deve ser realizado entre 30 a 35 % de MS pela melhor digestibilidade. Segundo Ferreira et al. (2006), quando híbridos graníferos são plantados para ensilagem, a maturidade ideal da planta deve ser aquela em que haja maior proporção de grãos, compatível com o teor de matéria seca da planta, para que se obtenha boa compactação e ocorra uma boa fermentação, elevando o valor nutritivo da silagem. Recomenda-se que o processo de ensilagem seja o mais rápido possível, antes que haja aumento do teor de matéria seca nos grãos.

Neumann et al. (2006) e Lopes et al. (2007) descreveram que o estágio de maturidade ideal para a ensilagem do milho depende muito do componente que determina o teor de matéria seca na massa ensilada, ou seja, da espiga. Segundo Hernandez et al. (2005), comparando três estádios de maturidade, o corte com 1/4 de avance da linha de leite permite melhora significativa da digestibilidade. Johnson et al. (2002), avaliando 2 híbridos de milho, concluíram que a maturidade afeta a digestibilidade da planta e, conseqüentemente, diminui o desempenho animal, confirmando que o ponto ótimo de colheita é quando se observa a linha do leite em dois terços do grão.

Segundo Silva (1997), a digestibilidade da matéria seca da planta sofre, normalmente, pequenas alterações com a maturação fisiológica. Isto pode ser explicado pelas diferenças nos componentes da planta em diferentes estádios de maturação, sendo que nos estádios iniciais existe maior participação do colmo na qualidade da planta. Posteriormente, em estádios mais

avançados, a maior proporção da fração colmo é substituída pela fração grãos, a qual é caracterizada por maior densidade energética e maior teor matéria seca. Em contrapartida, simultaneamente, o colmo perde qualidade pelo espessamento e lignificação da parede celular.

Quando se combinam efeitos de proporções de grão e digestibilidade das frações da planta, pode-se obter variações significativas na qualidade da silagem, devido à variabilidade entre híbridos. Segundo Cabral et al. (2002), o acréscimo de grãos à silagem aumenta linearmente os teores de MS, N e CNF, e reduz a MM, FDN, FDA e lignina, sendo muito importante levar em consideração a relação entre o conteúdo de grãos e a qualidade das frações da planta, uma vez que uma queda brusca da digestibilidade pode ocorrer devido à grande lignificação do colmo com a maturidade da planta, mascarando o efeito favorável do acúmulo de grãos na espiga.

Zeoula et al. (2003) avaliaram 5 híbridos de milho e concluíram que a elevação nos teores de MS na planta de 25 para 40% resultou em melhora na digestibilidade da MS (DIVMS) do colmo + bainha, em torno de 60 % para o híbrido superprecoce P30R21 e diminuição em 36 % para o semiprecoce P30F80. Para os híbridos precoces P30R07, P3041 e P30F33 não houve diferença e os melhores coeficientes de digestibilidade foram observados para a faixa de 30 a 38 % de MS.

Atualmente, o perfil de plantas de milho para ensilagem deve considerar, além da produtividade e da qualidade de colmos e folhas da planta, os efeitos da maturidade, uma vez que, com o avanço da maturidade, ocorre um aumento na porcentagem de grãos na silagem, porém um decréscimo na digestibilidade das outras partes da planta (NUSSIO, 2001). Rosales (2007) verificou correlação negativa entre a DIVMS e as variáveis FDN, FDA, hemicelulose, celulose e lignina, indicando que o aumento destas frações no alimento provoca redução da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do colmo, sendo estes resultados um indicativo do valor nutritivo total da planta inteira. Também Johnson et al. (2002), estudando duas variedades de milho, concluíram que o avanço da maturidade afeta a digestibilidade *in vitro* da FDN.

A escolha da cultivar a ser ensilada deve considerar, portanto, não apenas a proporção de grãos, mas também as demais frações da planta, pois a qualidade nutricional do colmo possui fortes correlações com a qualidade nutricional da planta inteira (CAETANO, 2001).

2.5.3 Efeito da maturidade sobre a qualidade nutricional de cana-de-açúcar

De maneira semelhante ao milho, uma das grandes vantagens da utilização da cana-de-açúcar para alimentação de ruminantes é a manutenção do valor nutricional por longo período de tempo (PRESTON, 1986; LENG, 1988). A diferença é que na cana-de-açúcar o armazenamento de carboidratos não fibrosos ocorre na forma de sacarose nos colmos, enquanto que na planta de milho, o armazenamento de carboidratos não fibrosos se dá na forma de amido nos grãos.

Avaliando variedades de cana-de-açúcar aos 6 e aos 24 meses, Kung Jr e Stanley (1982) observaram redução no teor de FDN (68,30 para 52,60 %), enquanto a lignina aumentou de 6,3 % para 7,3 %, respectivamente. Azevêdo et al. (2003) observaram aumento nos teores de FDN do primeiro para o segundo corte, sendo que o teor de FDN foi menor nos cortes subsequentes. Já o teor de lignina na planta toda sofreu queda de 14,1%, no primeiro corte, para 13,0% nos cortes subsequentes.

A medida que diminui a atividade vegetativa da cana-de-açúcar, com o avanço do estágio de maturação, os teores de açúcar (BRIX e POL) crescem até um máximo e, depois, voltam a cair (BRUGNARO et al., 1998). Avaliando três variedades, Landell et al. (1999) observaram um crescimento no teor de POL da cana-soca até a colheita de final de agosto, sendo que houve uma pequena redução no teor de POL entre a colheita de agosto e de outubro. Maule et al. (2001), ao avaliarem 9 cultivares colhidos em maio, agosto e outubro, observaram aumento no teor de POL para a colheita em outubro. Fernandes et al. (2003), avaliando a composição da cana em 3 idades de corte, observaram elevação linear do teor de brix. O efeito de diluição da FDN pelos crescentes teores de açúcares solúveis melhora o valor nutritivo da cana-de-açúcar como planta forrageira, uma vez que a fibra da cana apresenta como característica baixa digestibilidade e os açúcares são considerados prontamente digestíveis (LANDELL et al., 2002).

Andrade et al. (2004) compararam 60 genótipos de cana-de-açúcar cortados aos 12 e aos 18 meses e observaram redução no teor de PB de 2,59 para 2,34 %, respectivamente. Durante a maturação, ocorreu maior desenvolvimento dos colmos em relação ao número de folhas e, como a PB da cana-de-açúcar está concentrada principalmente em suas folhas, a maior relação colmo:folha irá causar redução relativa no teor de PB da planta.

2.5.4 Biossíntese de lignina

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 et al., 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 (Figura 1).

Fonte: Adaptado de Boudet et al (1995)

Figura 1- Via da biossíntese de monolignóis em plantas. **PAL**, fenilalanina amônio liase; **C4H**, cinamato 4-hidroxilase; **C3H**, p-cumarato 3-hidroxilase; **COMT**, ácido caféico/ácido 5-hidroxiferúlico O-metiltransferase; **F5H**, ferulato 5-hidroxilase; **4CL**, 4-cumarato CoA ligase; **CCR**, cianamil CoA redutase; **CAD**, cianamoil álcool desidrogenase; **CCoAOMT**, cafeoil CoA O-metiltransferase.

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; GRIMAPETTENATI; 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 C₄ (45-55% de digestibilidade da MS) em relação à gramíneas temperadas de ciclo C₃ (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 e na produção de etanol celulósico, porque a lignina precisa ser removida das fibras (BAUCHER et al., 2003).

Obviamente, a alteração do conteúdo e composição da lignina passa pelo conhecimento da rota de síntese e das enzimas envolvidas na síntese de lignina (Figura 1). 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 (Figura 2).

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).

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 et al., 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 et al., 2000). Estudos com digestão enzimática sugerem que o conteúdo de ferulato e digestibilidade da parede celular estão negativamente correlacionados (GRABBER et al., 1998) (Figura 3).

Segundo os modelos atuais do metabolismo de fenilpropanóides, seria impossível interferir com a biossíntese de ácido ferúlico sem simultaneamente alterar a lignificação. No entanto, a recente identificação de uma enzima necessária para síntese de ácido ferúlico, mas não de lignina, em mutantes de *Arabidopsis thaliana*, abre a possibilidade

para alterar o conteúdo de fenilpropanóides, e possivelmente melhorar a digestibilidade de gramíneas, sem comprometer o desempenho agrônomo (NAIR et al., 2004). Esta enzima é uma aldeído desidrogenase (**ALDH**) codificada pelo gene REF1 de *A. thaliana*, capaz de sintetizar ácido ferúlico a partir de coniferaldeído (NAIR et al., 2004). O silenciamento do gene REF1 em *A. thaliana*, reduziu pela metade o teor de éster de ácido ferúlico ligado à parede celular (NAIR et al., 2004). Enzimas com a mesma função de ALDH já foram identificadas em gramíneas, como milho e arroz (LI et al., 2000; SKIBBE et al., 2002).

Apesar de não ser conhecido como ocorre o controle da síntese de lignina, evidências experimentais sugerem que a deposição de lignina e sua composição ocorrem de maneira distinta em diferentes tecidos da planta e espécies vegetais (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996). 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).

2.6 REFERÊNCIAS

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

ALISCIONI, S. A.; GIUSSANI, L. M.; ZULOAGA, F. O.; KELLOGG, E. A. A molecular phylogeny of *Panicum* (Poaceae: Paniceae): test of monophyly and phylogenetic placement within the Panicoideae. **American Journal of Botany**, v. 90, p. 796-821, 2003.

ALLEN, M. S. Effect of diet on short-term regulation of feed intake by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 1598-1624, 2000.

ALVAREZ, C. G. D.; VON PINHO, R. G.; BORGES, I. D. Avaliação de características bromatológicas da forragem de milho em diferentes densidades de semeadura e espaçamentos entre linhas. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 30, n. 3, p. 409-419, 2006

ALVES DE BRITO, C. J. F.; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F. C. Chemical profile of cell wall and its implications on *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria humidicola* digestibility. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1835-1844, 2003.

ANDRADE, J. B.; FERRARO JR., E.; POSSENTI, R. A.; OTSUK, I. P.; ZIMBACK, L.; LANDELL, M. G. A. Composição química de genótipos de cana-de-açúcar em duas idades, para fins de nutrição animal. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 3, p. 341-349, 2004.

ANDRADE, J. B.; FERRARI JR., E.; POSSENTI, R. A. et al. Produção e composição de genótipos de cana-de-açúcar. **Boletim da Indústria Animal**, v. 60, n. 1, p. 11-22, 2003.

ANUALPEC: anuário da pecuária brasileira. 14. ed. São Paulo: FNP, 2007. 368 p.

AZEVEDO, J. A. G.; PEREIRA, J. C.; CARNEIRO, P. C. S.; QUEIROZ, A. C.; BARBOSA, M. H. P.; FERNANDES, A. M.; RENNO, F. P. Avaliação da divergência nutricional de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1431-1442, 2003.

BAL, M. A. Effects of Hybrid Type, Stage of Maturity, and Fermentation Length on Whole Plant Corn Silage Quality, **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, Ankara, v. 30, p. 331-336, 2006.

BALSALOBRE, M. A. A.; NUSSIO, L. G.; MARTHA JR.; G. B. Controle de perdas na produção de silagens de gramíneas tropicais. In: MATTOS, W. R. S. (Ed.). **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. p. 890-911

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., Fortaleza, 1996, **Anais...** Fortaleza: SBZ, 1996. p. 109-111.

BARRIÈRE, Y.; GUILLET, C. GOFFNER, D.; PICHON, M. Genetic variation of breeding strategies for improved cell wall digestibility in annual forage crops. A review. **Animal Research**, v. 52, n. 3, p. 193-228, 2003.

BAUCHER, M.; HALPIN, C.; PETIT-CONIL, M.; BOERJAN, W. Lignin: genetic engineering and impact on pulp. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 305-350, 2003.

BAUCHER, M.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 17, n. 2, p. 125-197, 1998.

BOIN C.; MATTOS, W. R. S.; D'ARCE, R.D. Cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. In: PARANHOS, S. B. **Cana-de-açúcar cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. II, p. 805-856.

BOREM, A.; GIÚDICE, M. P. Cultivares transgênicos. In: GALVÃO, J. C.; MIRANDA, G. V. (Org.). **Tecnologias de produção de milho**. Viçosa: UFV, 2004. p. 87.

BOUDET, A. M.; LAPIERRE, C.; GRIMA-PETTENATI, J. Biochemistry and molecular biology of lignification. **New Phytologist**, v. 129, n. 2, p. 203-236, 1995.

BRUGNARO, C.; HEISE, C. E.; PERES, F. C.; GIL, O. F. Maximização da produção de uma usina de açúcar. **Brasil Açucareiro**, v. 106, n. 5/6, p. 2-8, 1988.

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

CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; ZERVOUDAKIS, J. T.; SOUZA, A. L.; DETMANN, E. Degradabilidade in situ da matéria seca, da proteína bruta e da fibra de alguns alimentos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 777-781, 2005.

CAETANO, H. **Avaliação de onze cultivares de milho colhidos em duas alturas de corte para produção de silagem**. (Tese Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

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.

CARMO, C. A.; BERCHIELLI, T. T.; ANDRADE, P. et. al. Degradabilidade da matéria seca e fibra em detergente neutro da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) com diferentes fontes de proteína. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, n.6S, p.2132-2133, 2001.

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. et al. 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. Breeding for increased forage quality. In: LAMKEY, K. R.; LEE, M. (Ed.). **Plant breeding: arnel hallauer international symposium**. Oxford, UK: Blackwell Publishers. 2006. p.323-334.

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.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A. (Ed.). **Ecofisiologia de culturas extrativas. Cana-de-açúcar, seringueira, coqueiro, dendezeiro e oliveira**. Cosmópolis: Stoller do Brasil. 2001. 138p.

CAVALCANTE, A. C. R.; PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. C.; RIBEIRO, K. G.; GARCIA, R.; LANA., R. P. Dietas contendo silagem de milho (*Zea maiz L.*) e feno de capim-tifton 85 (*Cynodon spp.*) em diferentes proporções para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 2394-2402, 2004. Suplemento, 3.

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

CHERNEY, D. J. R.; CHERNEY, J. H. CHASE, L. E. PAS;COX, W. J. Milk Production in High Producing Dairy Cows as Influenced by Corn Silage Quality. **The Professional Animal Scientist**, v. 20, p. 302-311, 2004.

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

COORS, J. G. Findings of the Wisconsin corn silage consortium. In: SEEDS OF ANIMAL NUTRITION SYMPOSIUM, 1996, Rochester, New York. **Proceedings...** Rochester, 1996.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; CORRÊA, L. A.; PEREIRA, F. T. F.; OLIVEIRA, M. R. de. **Cultivares de milho**. Embrapa Milho e Sorgo. 2003. Disponível em: <www.portaldoagronegocio.com.br>. Acesso em: 3 out. 2008.

DAYNARD, T. B.; HUNTER, R. B. Relationships among whole-plant moisture, grain moisture, dry matters yield and quality of whole-plant corn silage. **Canadian Journal Plant Science**, v. 55, p. 77-84, 1975.

DEINUM, B.; BAKKER, J. J. Genetic differences in digestibility of forage maize hybrids. **Netherlands Journal Agricultural Science**, v. 29, p. 93-98, 1981.

DESCHAMPS, F. C. Effects of growing periods on digestion and chemical composition of Elephant Grass cultivars tissues. **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 28, p. 1358-1369, 1999.

DIB NUNES JR., M. S. Variedades de cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S. B. **Cana-de-açúcar cultivado e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. II, p. 187-259.

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

DWYER, L. M.; STEWART, D. W.; GLENN, F. Silage yields of Leafy and normal hybrids. p. 193-216. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM RESEARCH CONFERENCE. 53., 1998, Washington. **Proceedings...** Washington, DC.: Am. Seed Trade Assoc., 1998.

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.; VIEIRA, A.; OLIVEIRA, M. P. de. Evaluation of Panicum maximum cultivars under grazing. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 17., 1993, Palmerston North. **Proceedings...** Palmerston North: New Zealand Grassland Association, 1993. p. 1999-2000.

FERNANDES, A. M. et al. Composição químico-bromatológica de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp* L.) com diferentes ciclos de produção (precoce e intermediário) em três idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 4, p. 977-985, 2003.

FERREIRA, J. J.; RUAS, J. R. M.; SILVA, E. A. da; VIANA, M. C. M.; BARCELOS, A. F. Produção de grãos e fração fibrosa por diferentes cultivares de milho nos estágios de silagem e maturação completa. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Anais...** 2006.

FRANÇA, A. F. S.; BORJAS, A. L. R.; OLIVEIRA, E. R. de. et al. 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, 2007.

FREITAS, A.W. de P. et al. Avaliação da divergência nutricional de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 229-236, 2006.

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.

GIUSSANI, L. M.; COTA-SÁNCHEZ, J. H.; ZULOAGA, F. O.; KELLOGG, E. A. A molecular phylogeny of the grass subfamily Panicoideae (Poaceae) shows multiple origins of C₄ photosynthesis. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 1993-2012, 2001.

GOMES, M. S.; VON PINHO, R.G.; RAMALHO, M. A. P. et al. Variabilidade genética em linhagens de milho nas características relacionadas com a produtividade de silagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 879-885, 2004.

GORDON, C.H.; DERBYSHIRE, J.C.; VAN SOEST, P.J. Normal and late harvesting of corn for silage. **Journal of Dairy Science**, v.51, n.8, p.1258-1263, 1968.

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. **J Agric Food Chem**, v. 48, p. 6106-13, 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. et al. 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.

HERNANDEZ, G. N.; CONTRERAS, R. F.; CASTAÑEDA, F. G.; RAMOS, A. P. Madurez de híbridos de maíz a la cosecha para mejorar la producción e calidad del forraje. **Revista Técnica de la Pecuaria de Mexico**, v. 43, n. 1, p. 69-78, 2005.

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. et al. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 5407-12, 1998.

HUBER, J. T.; GRAF, G. C.; ENGEL, R. W. Effect of maturity on nutritive value of corn silage for lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 48, p. 1121-1123, 1965.

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

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200810_5.shtm>. Acesso em: 24 nov. 2008.

JANK, L. Potencial do gênero Panicum. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FORRAGEIRAS E PASTAGENS, 1994, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 1994. p. 25-31.

JOHNSON, L. M.; HARRISON, J. H.; DAVIDSON, D.; SWIFT, M.; MAHANNA, W. C. SHINNERS, K. Corn silage management II: Effects of hybrid, maturity, and mechanical processing on digestion and energy content. **Jornal Dairy Science**, v. 85, p. 2913-2927, 2002.

JOHNSON, R. R.; MCCLURE, K. E. Corn plant maturity. IV. Effects on digestibility of corn silage in sheep. **Journal Animal Science**, v. 27, n. 2, p. 535-540, 1968.

KUNG JR., L.; STANLEY, R.W. Effects of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugarcane preserved as silage. *Journal of Animal Science*, v. 54, p. 689-696, 1982.

LANDELL, M. G. A.; ALVAREZ R.; ZIMBACK, L.; CAMPANA M. P., SILA, M. A.; PEREIRA, J. C. V. N. A.; PERECIN D.; GALLO, P. B.; MARTINS, A. L. M.; KANTHACK, A.; FIGUEIREDO P.; VASCONCELOS C. M. Avaliação final de clones IAC de cana-de-açúcar da série 1982, em Latossolo Roxo da Região de Ribeirão Preto. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 1-13, 1999.

LANDELL, M.G.A.; CAMPANA, M.P.; RODRIGUES, A.A.; et al. A variedade IAC84-2480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros: manejo de produção e uso na alimentação animal. **Boletim Técnico IAC 193**, Campinas:Instituto Agrônômico. 2002, 39p.

LENG, R. A. Limitacion metabolicas en la utilización de la cana y sus derivados para el crecimiento e producción de leche en ruminantes. In: SISTEMAS INTENSIVOS PARA PRODUCCIÓN ANIMAL Y ENERGIA RENOVABLE CON RECURSOS TROPICALES, 1988, Cali, Colombia. **Simpósio...** Cali: CPAC, 1988. p. 31038.

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

LOPES, F. C. F.; AROEIRA, L. J. M. Degradabilidade do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.) e da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.) mais uréia no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 4, p. 383-386. 1999.

LOPES, S. J.; LÚCIO, A. D.; STORCK, L.; DAMO, H. P.; BRUM, B.; SANTOS, V. J. Relações de causa e efeito em espigas de milho relacionadas aos tipos de híbridos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1536-1543, 2007.

LOURES, D. R. S.; NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S. F.; PEDROSO, A. F.; MARI, L. J.; RIBEIRO, J. L.; ZOPOLLATO, M.; SCHMIDT, P.; JUNQUEIRA, M. C.; PACKER, I. U.; CAMPOS, F. P. Composição bromatológica e produção de efluente de silagens de capim-Tanzânia sob efeitos do emurchecimento, do tamanho de partícula e do uso de aditivos biológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 723-735, 2005.

LUNDEVALL, J. P.; BUXTON, D. R.; HALLAUER, A. R.; GEORGE, J. R. Forage quality variation among maize inbreds: in vitro digestibility and cell wall components. **Crop Science**, v. 34, p.1672-1678, 1994.

MA, B. L.; SUBEDI, K. D.; STEWART, D. W.; DWYER, L. M. Dry Matter Accumulation and Silage Moisture Changes after Silking in Leafy and Dual-Purpose Corn Hybrids. **Agronomy Journal**, v. 98, p. 922-929, 2006.

MAHANNA, W. C. Genetic selection for forage nutritional quality. In: ONTARIO MINISTRY OF AGRICULTURE AND FOOD, 1994, Ontario. **Proceedings...** Ontario: Guelph & Brockville, 1994. "Quality Forage and Ruminants".

MASOERO, F.; ROSSI, F.; PLUMINEO, A. M. Chemical composition and in vitro digestibility of stalks leaves and cobs of four corn hybrids at different phenological stages. **Italian Journal of Animal Science**, v. 5, p. 215-227, 2006.

MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA JUNIOR, G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 295-301, 2001.

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

MINSON, D. J. **Forage in ruminant nutrition**. San Diego: Academic Press, 1990. 483 p.

MIRANDA, J. E. C.; RESENDE, H.; VALENTE, J. O. Plantio de milho para silagem. Embrapa gado de leite. 2006. Disponível em: <www.portaldoagronegocio.com.br>. Acesso em: 5 out. 2008.

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. et al. 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.

NELSON, C. J.; MOSER, L. E. Plant factors affecting forage quality. In: FAHEY JUNIOR, G. R. (Ed.). **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison, Wisconsin: ASA/CSSA/SSSA, 1994. Ch.3, p. 115-154.

NEUMANN, M.; OST, P. R.; LUSTOSA, S. B. C.; ANDREY DE RE, D.; DEFAVERI, F. J.; OLIVEIRA, M. R. de; ROMANO, M. A.; PELLEGRINI, L. G. de. Comportamento produtivo de híbridos de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) para produção de silagem. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Anais...** 2006.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Revised Edition. Washington: National Academy of Sciences, 2001. 381 p.

NUSSIO, L. G. CAMPOS, F. P.; DIAS, F. N. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO, 2001. 319 p.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 3, p. 589-596, 1999.

OBA, M.; ALLEN, M. S. In vitro digestibility of forages. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 2005, Fort Wayne, Indiana, USA. **Proceedings...** 2005.

PEREIRA, E. S. et al. Fontes nitrogenadas e uso de *Sacharomyces cerevisiae* em dietas à base de cana-de-açúcar para novilhos: consumo, digestibilidade, balanço nitrogenado e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 563-572, 2001.

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.

PRESTON, T. R. Analytical methods for characterizing feed resources for ruminants. In: _____ (Ed.). **Better utilization of crop residues and by products in animal feeding: research guidelines**. 2. A practical manual for research workers. Rome: FAO. 1986. 106 p.

PRESTON, T. R. Nutritional limitations associated with the feeding of tropical forages. **Journal of Animal Science**, v. 54, n. 4, p. 877-884, 1982.

QUEIROZ, O. C. M.; NUSSIO, L. Q.; SCHMIDT, P.; RIBEIRO, J. L.; SANTOS, M. C.; ZOPOLLATTO, M. Silagem de cana-de-açúcar comparada a fontes tradicionais de volumosos suplementares no desempenho de vacas de alta produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 358-365, 2008.

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

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

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

RODRIGUES, A. A. et al. Efeito da qualidade de variedades de cana-de-açúcar sobre seu valor como alimento para bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1333-1338, 1997.

RODRIGUES, A. L. P.; SAMPAIO, I. B. M.; CARNEIRO, J. C. et al. 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, 1986. p. 375-387.

ROMERO, L.; ARONNA, S. Siembra de maíz para silaje. 2007. Disponível em: <http://www.engormix.com/S_articles_view.asp?art=616>. Acesso em : out. 2008.

ROSALES, L. A. **Produtividade e valor nutritivo de híbridos de Milho para silagem em função do espaçamento e da densidade de semeadura**. 2007. 28 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

ROTH, L. S.; MARTEN, G. C.; COMPTON, W. A.; STUTHMAN, D. D. Genetic variations of quality traits in maize (*Zea Mays* L.) forage. **Crop Science**, v. 10, p. 365-367, 1970.

SALLAS, M. et al. Effect of variety, stage of maturity and nitrate fertilization on nutritive values of sugar canes. **Anim. Feed Sci. and Techn.**, v. 39, n. 2, p. 265-277, 1992.

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.

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. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 843-851, 2004.

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

SCHMID, A. R.; GOODRICH, R. D.; JORDAN, R. M.; MARTEN, G. C.; MEISKE, J. C. Relationships among agronomic characteristics of corn and sorghum cultivars and silage quality. **Agronomy Journal**, v. 68, p. 403-406, 1976.

SCHMIDT, P.; MARI, L. J.; NUSSIO, L. G.; PEDROSO, A. F.; PAZIANE, S. F.; WECHSLER, F. S. Aditivos químicos e biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar. 1. Composição química das silagens, ingestão, digestibilidade e comportamento ingestivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 666, 2007.

SELMAN-HOUSEIN, G.; LOPEZ, M. A.; HERNANDEZ, D. et al. Molecular cloning of cdnas coding for three sugarcane enzymes involved in lignification. **Plant Science**, v. 143, p. 163-171, 1999.

SEWALT, V. J. H.; NI, W. T.; JUNG, H. G. et al. 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 (USA)**, v. 45, p. 1977-1983, 1997.

SILVA, L. F. P. **Avaliação de características agronômicas e nutricionais de híbridos de milho para silagem**. 1997. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1997.

SILVA, W. P.; AYALA-OZUNA, T. J.; MORO, R. J.; MARTINS, R. M. Avaliação de híbridos interpopulacionais de milho quanto a características químicas e agronômicas para silagem. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 3, p.111-120, 2003.

SKIBBE, D. S.; LIU, F.; WEN, T. J. et al. Characterization of the aldehyde dehydrogenase gene families of *Zea mays* and *Arabidopsis*. **Plant Mol Biol**, v. 48, p. 751-64, 2002.

SONON, R. N.; DALKE, B. S.; BOLSEN, K. K.; BOYER, J. E. Effect of grain content on nutritive value of whole-plant corn silage. **Journal of Animal Science**, v.71, p.266, 1993. Suplemento, 1.

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

TAVARES, V. B.; PINTO, J. C.; EVANGELISTA, A. R.; FIGUEIREDO, H. C. P.; ÁVILA, C. L. S.; LIMA, R. F. Efeitos da compactação, da inclusão de aditivo absorvente e do emurchecimento na composição bromatológica de silagens de capim-tanzânia. **Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science**, v. 38, p. 40-49, 2009

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. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 19, p. 47-48, 1990.

VIEIRA JUNIOR, P. A.; NETO, D. D.; BERNARDES, M. S.; FANCELLI, A. L.; MARTINT, M. Metodologia para estimativa da área foliar de genótipos de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 5, n. 2, p. 182-191, 2006.

VILELA, H. H.; REZENDE, A. V.; VIEIRA, P. F.; ANDRADE, G. A.; EVANGELISTA, A. R.; ALMEIDA, G. B. S. Valor nutritivo de silagens de milho colhido em diversos estádios de maturação. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 37, n. 7, p. 1192-1199, 2008.

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. **J Dairy Sci**, v. 74, p. 3872-83, 1991.

WATTIAUX, M. Introduction to Silage-Making. Dairy Updates. Feeding No. 502. 1999. The Babcock Institute. Disponível em:
<http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/du/du_502.en.pdf>. Acesso em: 16 nov.2008.

WEBSTER, R. D. **The Australian paniceae (Poaceae)**. Berlin: J. Cramer, 1987. p. 228-255. 1987.

WEISS, W. P.; WYATT, D. J. Effects of feeding diets based on silage from corn hybrids that differed in concentration and in vitro digestibility of neutral detergent fiber to dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 3462-3469, 2002.

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

WILSON, J. R. Organization of forage plant tissues. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATIFIELD, R. D.; RALPH, J. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy, 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. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 27, n. 3, p. 343-354, 1976.

ZEOULA, L.M.; BELEZE, J. R. F.; CECATO, U.; JOBIM, C.; GERON, V. J.; PRADO, P. P.; FALCÃO, S. J. Avaliação de cinco híbridos de milho (*Zea mays*, L.) em diferentes estádios de maturação. 4. Digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e fibra em detergente neutro da porção vegetativa e planta inteira, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 567-575, 2003.

ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O.; GIUSSANI, L. M. A cladistic analysis of the Paniceae: a preliminary approach. In: JACOBS, S. W. L.; EVERETT, J. (Ed.). **Grasses: systematics and evolution**. Austrália: CSIRO, 2000. p. 123-135.

**Capítulo 3 - Características de produção e qualidade nutricional
de genótipos de *Panicum maximum* colhidos em
três estádios de maturidade**

RESUMO

A queda da digestibilidade da parede celular com a maturidade é fator importante limitando o desempenho de bovinos. Objetivou-se verificar a existência de variação genética entre cultivares de *Panicum maximum* quanto ao efeito da maturidade sobre a composição química e digestibilidade de colmo e folhas, e classificar os genótipos de acordo com características produtivas e de qualidade nutricional. Foi utilizado o delineamento de blocos ao acaso, em esquema de parcela subdividida, com três repetições. A parcela experimental foi composta de seis linhas com 4 m de comprimento, espaçadas 0,5 m, sendo considerada como parcela a data de corte, e como sub-parcela os genótipos. A produção de MS foi diferente entre os genótipos somente aos 90 dias de crescimento. Houve variação entre os genótipos quando à porcentagem de folhas, colmos e material morto com 60 e 90 dias de crescimento. Os genótipos apresentaram grande variabilidade na composição química e digestibilidade do colmo, ao contrário do observado para as folhas. Comparando as duas frações, o colmo apresentou concentrações mais elevadas de FDN, FDA e lignina, e menores valores de PB. O colmo apresentou maior digestibilidade da MS com 60 dias de crescimento e maior digestibilidade da FDN com 30 e 60 dias de crescimento do que folhas. O agrupamento das cultivares permitiu identificar os genótipos PM39 e PM47 como promissores no programa de melhoramento, por apresentarem alta produtividade, alta porcentagem de folhas e alta digestibilidade da FDN do colmo. A maturidade pouco afeta a digestibilidade de folhas, quando comparado com o colmo. Como a participação de colmo no total de massa seca se amplia, o colmo passa a ser o limitador da qualidade de plantas forrageiras. Portanto, programas de melhoramento deveriam levar em conta não somente a relação folha:colmo mas também a DIVFDN do colmo para seleção de genótipos

Palavras-chave: Colmo. Digestibilidade. Gramíneas tropicais. Lignina. Nutrição animal. Parede celular.

ABSTRACT

The decline in cell-wall digestibility with maturity is a major factor limiting productivity of bovines. Our objectives were to determine the genetic variability in the effect of maturity on chemical composition and digestibility of stem and leaves, among *Panicum maximum* genotypes, and classify the genotypes according to production and quality parameters. A randomized block design with split-plot was used, with three replications. The experimental plot was composed of six lines with 4 m of length spaced by 0.5 m. The age at harvest was considered the plot and the genotypes the sub-plots. Dry matter production was different among genotypes only with 90 days of regrowth. There was variation among genotypes for percentage of leaves, stem and senesced material with 60 and 90 days of regrowth. There was large variability for the chemical composition and digestibility of the stem, however, there was no genotype effect for the leaves. Comparing both fractions, the stem had higher NDF, ADF and lignin content, and lower CP values. However, the stem had higher DM digestibility with 60 days of regrowth, and higher NDF digestibility with 30 or 60 days of regrowth than the leaves. Clustering of the cultivars identified the genotypes PM39 and PM47 as promising for the breeding program, for aggregating high productivity, high percentage of leaves and high NDF digestibility of the stem. Maturity has little effect on leaves digestibility, when compared to stem. As the participation of stem in total dry mass increases, the stem becomes the major factor limiting quality of forages. Therefore, breeding programs should take into account not only the leaves:stem ratio but also stem NDF digestibility when selecting genotypes

Keywords: Animal nutrition. Cell wall. Digestibility. Lignin. Stem. Tropical grasses.

3.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de bovinos de corte ocorre predominantemente em pasto, onde as pastagens tropicais são as principais fontes de alimento para os ruminantes, sendo sensivelmente mais econômica em relação aos concentrados (AGUIAR et al., 2000). O *Panicum 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).

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). 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 hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose, limitando a digestão da parede celular de forragem (RODRIGUES et al., 2004).

A relação entre lâminas e colmos é parâmetro importante na avaliação da qualidade das plantas forrageiras, principalmente em razão das folhas apresentarem melhor valor nutricional, afetando assim o consumo voluntário dos animais (RODRIGUES, 1986; HERRERA, 1979; HACKER; MINSON, 1981),

A digestibilidade da fração fibrosa é fundamental na avaliação da qualidade das plantas forrageiras, já que as frações não digeríveis ocupam o trato digestivo reduzindo o espaço ruminal e o consumo de MS (THIAGO; GILL, 1990). Assim, o desempenho de animais em pasto depende não só da quantidade de parede celular, mas também da digestibilidade da mesma.

Objetivou-se verificar a existência de variação genética entre cultivares de *P. maximum* quanto ao efeito da maturidade sobre a composição química e digestibilidade de colmo e folhas, e classificar os genótipos em grupos de acordo com características produtivas e de qualidade nutricional

3.2 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 530,7 m, o solo tipo Neossolo (EMBRAPA, 1999) e o padrão climático da região é descrito, segundo Köppen, na faixa de transição entre Cfa e Aw tropical úmido. A precipitação média anual é de 1500 mm, sendo considerados meses de seca, de maio a setembro (30% da precipitação anual).

Foi estabelecido ensaio de avaliação de 11 genótipos de *Panicum maximum*: Cultivares Massai, Milênio, Mombaça e Tanzânia e genótipos PM39, PM40, PM41, PM44, PM45, PM46 e PM47 em área da Embrapa Gado de Corte. As parcelas foram adubadas com 100 kg/ha de N (uréia), 100 kg/ha de P₂O₅ (superfosfato simples) e 100 kg/ha de K₂O (cloreto de potássio). Após 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 foram formadas por 6 linhas espaçadas de 0,5 metros (m) por quatro metros 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, relação folha:colmo e composição bromatológica. A condição climática 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-CNPQC.

Após o corte das duas linhas, as amostras foram pesadas e uma sub-amostra de aproximadamente 1,5 kg foi retirada, pesada e separada em lâminas foliares (fração folhas), bainhas foliares e colmos (fração colmo) e material senescido (fração morto). As sub-amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e permaneceram congeladas a -20°C para posterior análise. As amostras foram secas em estufa com ventilação forçada de ar a 55°C, por 72 horas para estimativa inicial da matéria seca. As amostras secas foram

moídas com peneira de malha de 1 mm e posteriormente analisadas para determinação da MS total, em estufa a 105°C por 24 horas.

De posse do peso total da amostra e dos teores de MS, determinou-se a produção total de matéria seca verde (MSV) somando-se as produções de MS de folhas e colmos, ou seja, descontando-se a produção de MS de material morto (BARBOSA et al., 2002).

Os teores de proteína bruta (PB) foram analisados segundo AOAC (1980), e os teores de FDN, fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram determinados conforme Goering e Van Soest (1970). 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). O fluido ruminal foi coletado de três vacas mantidas a pasto recebendo suplementação mineral. As amostras foram incubadas por 30 horas a 39°C em estufa de temperatura controlada. Durante este tempo, os frascos foram agitados três vezes por dia. Ao final do período de incubação, os frascos foram removidos da estufa, adicionou-se 20 mL de solução detergente neutro e foram mantidos estocados a -20°C para análise posterior do teor de FDN segundo Goering e Van Soest (1970).

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 software SAS (SAS, 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 $\times$ 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). O estudo das correlações entre digestibilidade de colmo e folhas, e componentes químicos da parede celular, foi realizado de acordo com o procedimento PROC CORR (SAS, 2000).

Após a obtenção dos resultados laboratoriais, procedeu-se à redução dos valores à média dos genótipos, empregando-se a produção de MSV, DIVFDN da fração colmo e a porcentagem de folhas na MS com 90 dias de crescimento como base para análise multivariada de agrupamento por otimização, segundo o método de Tocher (CRUZ; REGAZZI, 1997). Adotou-se a distância euclidiana média como medida básica de dissimilaridade, calculada após a padronização das informações.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos genótipos de *Panicum maximum*, o aumento linear na produção de matéria seca verde está relacionado com a alongação do colmo. Isto pode ser observado pela redução média de 91,1% para 54,1% de participação da massa de folhas na massa total, quando os genótipos foram colhidos com 30 e 90 dias (Tabela 2). A produção de MSV foi diferente entre os genótipos somente quando colhidos com 90 dias de crescimento (Tabela 2). Houve interação significativa ($P < 0,05$) entre Maturidade x Genótipos para produção de MSV, porcentagem de folhas, colmo e material morto. Quanto à produção de MSV, houve diferença entre os genótipos somente quando colhidos com 90 dias de crescimento (Tabela 2).

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 2). Dentre as cultivares avaliadas, o capim-mombaça apresentou maior produção de MSV com 90 dias do que as cultivares Massai e Tanzânia, e similar à cultivar Milênio (Tabela 2). A maior produção do capim-mombaça frente às demais cultivares de *P. maximum* foi verificada em outros experimentos (JANK et al., 1994).

Quanto à proporção de folhas, houve diferença entre os genótipos quando colhidos com 60 ou 90 dias de crescimento (Tabela 2). Dentre as cultivares testadas, o Massai apresentou o menor alongamento 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 das outras 3 cultivares avaliadas (Tabela 2). A maior proporção de folhas da cultivar Massai em relação às 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 das cultivares Tanzânia e Mombaça, obtendo valores muito semelhantes ao aqui reportados. Já Quadros et al. (2002) relataram 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 entre os genótipos quando colhidos com 60 ou 90 dias de crescimento (Tabela 2). As cultivares Milênio e Mombaça apresentaram as menores porcentagens de material morto, dentre as cultivares avaliadas.

1
2

Tabela 2 - 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	7.067	11.437 ^{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	7.014	18.238 ^{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	4.432	22.857 ^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	3.734	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	4.411	17.730 ^{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	4.571	12.664 ^{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	12.160 ^{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	4.355	9.035 ^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	5.893	12.580 ^{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	5.701	11.047 ^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 ^c	14,8 ^b	30,7 ^a	-	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	**	**	-	**	**

3
4
5
6
7
8
9

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. ⁴Probabilidade de efeito significativo de genótipo. Esses são classificados como: ns: não significativo; * P<0,05; **: P<0,01. ^{ABCDEF} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si.

^{abc} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si.

O teor de MS da fração colmo dos genótipos aumentou linearmente com a maturidade, passando de 12,9% para 23,7%, quando colhidos com 30 ou 90 dias, respectivamente (Tabela 3). Houve diferença entre os genótipos quanto ao teor de MS do colmo somente quando colhidos com 30 dias de crescimento (Tabela 3). O teor de FDN do colmo aumentou linearmente com a maturidade, sendo que os genótipos só diferiram entre si quando colhidos com 30 dias de crescimento (Tabela 3). Dentre as cultivares testadas, a cultivar Massai apresentou maior teor de FDN do colmo com 30 dias de crescimento do que as cultivares Milênio e Mombaça, e não diferiu da cultivar Tanzânia (Tabela 3).

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 3). 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 (Tabela 3). Houve diferença entre os genótipos no teor de lignina do colmo somente quando colhidos com 90 dias de crescimento (Tabela 3). Com 90 dias de crescimento, a cultivar Mombaça apresentou maior concentração de lignina (%FDN) no colmo do que as cultivares Massai e Tanzânia, e não diferiu da cultivar Milênio (Tabela 3). 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. A digestibilidade da parede celular é um dos principais limitadores do desempenho de animais ruminantes em países tropicais (WATTIAUX et al., 1991). Assim, é importante a seleção de novas plantas forrageiras que possuam maior digestibilidade da FDN e que mantenham alta digestibilidade da FDN mesmo em estágios avançados de maturidade. Colmo e folhas apresentam composição bromatológicas distintas, e a maturidade afeta de maneira diferente as duas frações e, sendo assim, é importante que os programas de melhoramento de plantas forrageiras atuem separadamente sobre as duas frações (WILSON, 1993).

Tabela 3 - Composição bromatológica da fração colmo de 11 genótipos de *Panicum 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. Esses são classificados como: ns: não significativo; * P<0,05; **: P<0,01. ^{ABCD}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si. ^{abc}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si.

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 em ambos (Tabela 4).

Tabela 4 - Digestibilidade *in vitro* da fração colmo de 11 genótipos de *Panicum 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 a partir de corte de nivelamento em 29/12/2005. ⁴EPM: Erro padrão da média. ⁵Probabilidade de efeito significativo de genótipo. Esses são classificados como: ns: não significativo; * P<0,05; **: P<0,01.

^{ABCD} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si.
^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si.

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 4). Entre as cultivares avaliadas, a cultivar Massai apresentou um dos menores valores de DIVMS e DIVFDN do colmo com 30 dias, porém um dos maiores valores de DIVMS e DIVFDN do colmo com 90 dias de crescimento (Tabela 4). Estes resultados demonstram que o capim-massai sofre menor queda da DIVFDN do colmo com o avanço da maturidade do que as demais cultivares testadas, no entanto, a DIVFDN inicial (30 d) do colmo do capim-massai é baixa. Este comportamento do capim-massai pode estar associado ao menor alongamento de colmo e manutenção de maior proporção de folhas após 90 dias de crescimento (Tabela 2).

As demais cultivares comerciais avaliadas apresentaram grande queda na DIVFDN e DIVMS de 60 para 90 dias de crescimento (Tabela 4). Dentre 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 4).

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 78,5% para o FDN e 52,1% para o FDA e estes teores elevados nessa idade podem ser responsáveis pela baixa DIVMS da fração colmo. Em geral, o incremento na FDN da forragem está associado ao incremento de parede celular, que promove redução na DIVMS (VAN SOEST, 1994; RÊGO, 2003).

Ao contrário do elevado efeito genético sobre a qualidade do colmo, houve pequena variação genotípica quanto à composição bromatológica e digestibilidade de folhas (Tabelas 5 e 6). Os genótipos variaram somente quanto ao teor de lignina (%FDN) na folha quando colhidos com 90 dias de crescimento (Tabela 5). Dentre as cultivares estudadas, o capim-tanzânia apresentou menor teor de lignina (%FDN) na folha do que a cultivar Milênio, quando colhidas com 90 dias de crescimento (Tabela 5). O menor teor de lignina (%FDN) da folha do capim-tanzânia colhido com 90 dias de crescimento, não resultou em maior DIVFDN com 90 dias de crescimento, entre os 11 genótipos estudados (Tabela 6).

Na média dos genótipos, houve aumento linear dos teores de MS, FDA e lignina de folhas, e redução dos teores de DIVMS e DIVFDN com o avanço da maturidade (Tabelas 5 e 6). Quanto ao teor de FDN de folhas, houve 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 5).

Da mesma forma que ocorreu no colmo, não houve diferença na porcentagem média da PB de folhas entre 30 e 60 dias de crescimento, e houve queda acentuada de 60 para 90 dias de crescimento (Tabela 5). Não houve variação entre os genótipos estudados quanto ao teor de PB nas folhas (Tabela 5).

Tabela 5 - Composição bromatológica da fração folha de 11 genótipos de *Panicum 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. Esses são classificados como: ns: não significativo; * P<0,05; **: P<0,01. ^{AB}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si. ^{abc}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si.

Tabela 6 - Digestibilidade *in vitro* da fração folha de 11 genótipos de *Panicum 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.
⁵Probabilidade de efeito significativo de genótipo. Esses são classificados como: ns: não significativo; * P<0,05; **: P<0,01.
^{ab}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si.

Avaliando-se a correlação entre os componentes da parede celular e a DIVMS ou DIVFDN, nota-se que houve forte correlação negativa entre o teor de FDN e a DIVMS do colmo (Tabela 7). O teor de lignina na base da MS (%MS) e na base da FDN (%FDN) foram as medidas bromatológicas melhor correlacionadas com DIVMS e DIVFDN do colmo ($r = -0,91 - P<0,01$ e $r = -0,88 - P<0,001$, respectivamente) (Tabela 7).

Tabela 7 - Matriz de correlações entre composição química e digestibilidade da MS e FDN do colmo e de folhas de onze genótipos de *Panicum maximum* colhidos em três idades

	Colmo		Folhas	
	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).

A relação existente entre lignificação e DIVFDN já foi demonstrada anteriormente (JUNG; ALLEN, 1995). Como a lignina é um componente da parede celular, o efeito da

lignina sobre a digestibilidade da forragem é tido como sendo um efeito direto na digestibilidade da fibra, e não da matéria orgânica total da forragem (VAN SOEST, 1993). Como o teor de FDN e de lignina estão normalmente correlacionados, pode ocorrer uma correlação indireta entre % de lignina na MS e DIVMS.

A menor digestibilidade da MS de plantas em estágio avançado de desenvolvimento está normalmente associada com maiores teores de FDN (MERTENS, 1994), no entanto, para a fração folha no presente trabalho, esta relação não existiu (Tabela 7). O decréscimo na DIVMS média da fração folha com o avanço da maturidade (Tabela 6) está de acordo com o aumento nos teores médios de FDA e lignina desta fração (Tabela 5), entretanto a correlação foi baixa (Tabela 7).

A fraca correlação entre os componentes da parede celular com a DIVMS, ou com a DIVFDN, pode ser explicada pela pequena variação genética para estes parâmetros nas folhas. Como observado anteriormente, não houve variação entre os genótipos para nenhum parâmetro avaliado, somente para teor de lignina aos 90 dias de crescimento (Tabelas 5 e 6).

Alves de Brito et al. (2003) demonstraram a existência de grande variação da DIVMS e DIVFDN de folhas de *Brachiaria brizantha* de acordo com a altura de corte, sendo que a porção apical apresentou maior DIVMS e DIVFDN do que a porção basal, sem diferir quantos aos valores de FDN. Estes resultados sugerem que o decréscimo da DIVMS de folhas 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).

Comparando-se o colmo e folhas, nota-se que o colmo teve maiores valores de FDN e FDA nas 3 idades de corte, maiores valores de lignina com 30 e 90 dias de crescimento, e menores valores de PB nas três idades de corte (Tabela 8). Todavia, o colmo apresentou maior DIVMS com 60 dias de crescimento e maior DIVFDN com 30 e 60 dias de crescimento (Tabela 8). O que se observa é que o avanço da maturidade teve grande efeito sobre a qualidade do colmo, porém teve pequeno efeito sobre a qualidade da fração folha (Tabela 8).

Tabela 8 - Composição química e digestibilidade *in vitro* da fração colmo e da fração folhas de onze genótipos de *Panicum 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 ^a	6,1 ^a	0,2
	90 d	6,6 ^b	9,1 ^a	0,2
DIVMS ¹ , %MS	30 d	54,2 ^a	57,1 ^a	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 ^a	31,9 ^a	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.

Com 30 ou 60 dias de crescimento, a digestibilidade da MS e da FDN do colmo foi igual ou superior a de folhas. Todavia, após 90 dias de crescimento, o colmo apresentou menor DIVMS e igual DIVFDN que folhas (Tabela 8).

A maior digestibilidade do 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. Alves de Brito et al. (2003) relataram que a DIVFDN do colmo de *Brachiaria brizantha* colhido com 70 dias de crescimento foi superior a de folhas, o

que não ocorreu em *Brachiaria humidicula*.

O fato de o colmo ter melhor DIVFDN do que folhas quando colhido em até 60 dias têm implicações importantes sobre o manejo das pastagens, bem como sobre os programas de seleção de novas cultivares. 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 et al., 2003). Os resultados aqui apresentados sugerem que, principalmente para sistemas intensivos de exploração de *P. maximum*, a digestibilidade do colmo teria maior validade como medida da qualidade da planta do que simplesmente a relação folha:colmo.

Os genótipos mais produtivos normalmente são aqueles que apresentam maior alongamento de colmos. No presente estudo, foi encontrada correlação ($P<0,01$) entre porcentagem de colmos na MS e produção de MSV com 60 ou 90 dias de crescimento ($r = 0,62$ e $0,56$, respectivamente). A porcentagem de colmo na MS das cultivares colhidas com 60 e 90 dias se mostrou medianamente correlacionada ($P<0,01$) com a DIVFDN do colmo ($r = -0,51$ e $-0,48$ para 60 e 90 dias, respectivamente). Ou seja, as cultivares com maior proporção de colmos apresentam também colmos de menor digestibilidade da FDN, porém a correlação não foi forte. Não houve correlação significativa entre produção de MSV e DIVFDN de colmo com 60 ou 90 dias, e a digestibilidade de folhas não se mostrou correlacionada com nenhum parâmetro produtivo. 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 9).

Tabela 9 - Grupos de genótipos de *Panicum maximum* e média das variáveis em cada grupo

Itens	Grupo			
	I	II	III	IV
	PM44 PM46 Tanzânia	PM39 PM47	Massai PM40 PM41 PM45	Milenium 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.

O Grupo I representa os genótipos com produção intermediária de MSV, menor DIVFDN de 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.

3.4 CONCLUSÕES

Conclui-se que houve grande variação entre os genótipos em relação ao efeito da maturidade sobre a digestibilidade do colmo, porém não houve efeito dos genótipos sobre a digestibilidade de folhas. A maturidade pouco afeta a digestibilidade de folhas, quando comparado com o colmo. Como a participação de colmo no total de massa seca se amplia, o colmo passa a ser o limitador da qualidade de plantas forrageiras. Portanto, programas de melhoramento deveriam levar em conta não somente a relação folha:colmo mas também a DIVFDN do colmo para seleção de genótipos.

3.5 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. S.; VASQUEZ, H. M.; SILVA, J. F. C. da; Produção e composição químico-bromatológica do capim-furachão (*Panicum repens* L.) sob Adubação e diferentes idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 325-333, 2000.
- ALVES DE BRITO, C. G. F.; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F. C. Chemical profile of cell wall and its implications on *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria humidicola* digestibility. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p. 1835-1844, 2003.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 10. ed. Washington: AOAC International, 1980. 1015 p.
- BARBOSA, R.A.; NASCIMENTO JR., D.; EUCLIDES, V.P.B. et al. Características morfológicas e acúmulo de forragem do capim-Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) em dois resíduos forrageiros pós-pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.583-593, 2002.
- BRÂNCIO, P. A.; EUCLIDES, V. P. B.; NASCIMENTO JÚNIOR, D. et al. 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. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 55-63, 2003.
- CANO, C. C. P.; CECATO, U.; CANTO, M. W. et al. Produção de forragem do capim-tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia-1) pastejado em diferentes alturas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 1949-1958, 2004.
- CARVALHO, P. C. F.; RIBEIRO FILHO, H. M. N.; POLI, C. H. E. C. et al. 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.
- CECATO, U.; MACHADO, A. O.; MARTINS, E. N. et al. Avaliação da produção e de algumas características da rebrota de cultivares e acessos de *Panicum maximum* Jacq. sob duas alturas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 660-668, 2000.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 1997. 390 p.
- DIAS, F. J.; JOBIM, C. C.; BRANCO, A. F. et al. 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). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 211-220, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA E AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 412p.

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

EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M.; ZIMMER, A. H. et al. Avaliação dos capins mombaça e massai sob pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 1, p. 18-26, 2008.

FRANÇA, A. F. S.; BORJAS, A. L.R.; OLIVEIRA, E. R.de; et al. 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, 2007.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analysis: apparatus reagents, procedures and some applications**. Washington, DC, USA. Agricultural handbook, 1970. 379 p.

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

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.

JANK, L.; SAVIDAN, Y. H.; SOUZA, M. T. de et al. Avaliação do germoplasma de *Panicum maximum* introduzido na África. 1. Produção forrageira. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 23, n. 3, p. 433-440, 1994.

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

QUADROS, D. G.de; RODRIGUES, L. R. A.; FAVORETTO, V. et al. Componentes da produção de forragem em pastagens dos capins tanzânia e mombaça adubadas com quatro doses de NPK. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1333-1342, 2002.

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

RÊGO, F. C. A.; CECATO, U.; DAMASCENO, J. C. et al. 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: UNESP/FUNEP, 1993. 26 p.

RODRIGUES, A. L. P.; SAMPAIO, I. B. M.; CARNEIRO, J. C. et al. 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., Piracicaba, 1986. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1986. p. 375-387.

SANTOS, P. M.; BALSALOBRE, M. A. A.; CORSI, M. Morphogenetic characteristics and management Tanzânia grass. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 991-957, 2003.

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

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

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

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. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 19, p. 47-48, 1990.

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

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. **J Dairy Sci**, 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 of 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, 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.

Capítulo 4 - Variação genética da composição química e digestibilidade do colmo de genótipos de milho colhidos em três estádios de maturidade

RESUMO

Atualmente há o reconhecimento de que critérios de seleção que favorecem a produção de grãos podem ser indesejáveis para o valor nutricional de silagens de milho. Híbridos de milho para silagem devem maturar mais lentamente com declínio gradual da umidade da planta, ter grãos macios e colmo com alta digestibilidade da fibra. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da idade de corte sobre a qualidade nutricional do colmo de genótipos de milho, permitindo a seleção de materiais de melhor qualidade, com o intuito de definir critérios de seleção em programas de melhoramento de híbridos de milho para ensilagem que visem o aumento da digestibilidade da fibra do colmo. Objetivou-se ainda a classificação dos genótipos em grupos de acordo com suas características produtivas e de qualidade nutricional. Foram avaliados 15 híbridos de milho do programa de melhoramento do Instituto Agrônomo de Campinas, em ensaio sob delineamento de blocos ao acaso, com três repetições, colhidos com 90, 120 e 150 dias após a germinação. O 4º e 5º internódios do colmo, acima do solo, foram retirados para determinação da composição bromatológica e digestibilidade *in vitro*. Houve queda no teor de fibra e aumento na concentração de lignina com avanço da maturidade, em ambos os internódios. Houve aumento na digestibilidade da MS do 5º internódio com o avanço da maturidade, enquanto que não houve efeito sobre o 4º internódio. Ocorreu redução na digestibilidade da fibra do 4º internódio com o avanço da maturidade, enquanto que não houve efeito sobre o 5º internódio. A digestibilidade da fibra do 4º internódio foi negativamente correlacionada com a lignificação, enquanto que esta correlação foi inexistente no 5º internódio, indicando que o 4º internódio do colmo pode ser utilizado como indicador da queda de digestibilidade da fibra do colmo de híbridos de milho que ocorre com o avanço da maturidade. Verificou-se entre os 15 genótipos nas três idades de corte, grande variabilidade genética para os parâmetros de qualidade, o que realça a necessidade de seleção criteriosa do material a ser utilizado para silagem e a possibilidade de implantação de programas de melhoramento genético voltados para qualidade nutricional de híbridos de milho para silagem.

Palavras-chave: Degradabilidade. Lignina. Melhoramento genético. Parede celular. *Zea mays*.

ABSTRACT

Nowadays there is the recognition that selection criteria that favors grain production can be undesirable for nutritional value of corn silages. Corn hybrids for silage should mature slower with gradual decline of plant moisture, have softer grains and stalk with high fiber digestibility. Therefore, it was our objective to evaluate the effect of age of harvest on the stalk nutritional quality of corn hybrids, aiming to define selection criteria in breeding programs focused on improving the stalk fiber digestibility. It was still our objective the classification of genotypes in groups according to their production and nutritional qualities. Fifteen hybrids from the Instituto Agronômico de Campinas breeding program were evaluated in a random block design with three repetitions, harvested with 90, 120 and 150 days after germination. The 4th and 5th above soil stalk internodes were removed for determination of chemical composition and *in vitro* digestibility. The fiber content decreased and lignin content increased with advanced maturity, in both internodes. The DM digestibility of the 5th internode increased with maturity, while there was no change in the 4th internode. The fiber digestibility of the 4th internode was reduced with advanced maturity while there was no effect on the 5th internode. Fiber digestibility of the 4th internode was negatively correlated with lignification, while this correlation was inexistent for the 5th internode, indicating that the 4th internode could be used as an indicator of the decrease in stalk fiber digestibility that occurs with advanced maturity of corn hybrids. There was great genetic variability among the 15 genotypes in the three stages of maturity for the quality parameters, highlighting the necessity of careful selection of the material to be used for silage production and the possibility of implementing breeding programs focused on improving the nutritional quality of corn hybrids for silage.

Keywords: Breeding. Cell wall. Degradability. Lignin. Zea mays.

4.1 INTRODUÇÃO

A produção de animais ruminantes é altamente dependente de forragens (ANUALPEC, 2007). Como as forragens possuem alta concentração de parede celular, normalmente o desempenho de animais de alta produtividade é limitado principalmente pela taxa de digestão e passagem pelo rúmen da fração fibrosa da dieta (OBA; ALLEN, 1999; BARRIÈRE et al., 2003) e, portanto, o aumento da digestibilidade da parede celular se tornou um objetivo de vários programas de melhoramento de forragens e híbridos de milho para produção de silagem (GOMES et al., 2004; MASOERO et al., 2006).

O milho é considerado planta padrão para ensilagem, na alimentação de produção leiteira e de corte, pois quase sempre produz silagem de boa qualidade, com perdas muito reduzidas. No entanto, é preciso observar o grau de maturidade ideal em que a planta de milho deve ser colhida e, assim, estabelecer o efeito do grau de maturidade da planta, no momento da colheita, sobre o valor nutritivo da silagem.

Até recentemente, era comumente aceito que as características de um bom híbrido de milho para silagem eram aquelas de um bom híbrido de milho para grãos, baseado na suposição que o valor nutritivo de uma silagem é predominantemente influenciado pelo teor de grãos (MA et al., 2006). Atualmente há o reconhecimento de que critérios de seleção como grãos duros de alta densidade e com rápida taxa de secagem, e hastes fortes, que favorecem a produção de grãos, podem ser indesejáveis para a colheita, fermentação e digestibilidade da silagem de milho. Híbridos de milho para silagem devem maturar mais lentamente com declínio gradual da umidade da planta, ter grãos macios e baixo teor de fibra em detergente neutro (FDN) com alta digestibilidade do FDN (DWYER et al., 1998).

Com o avanço da maturidade, ocorre queda na digestibilidade dos tecidos da haste de forragens, e esta queda está associada ao acúmulo de lignina (BRITO et al., 2003). Entretanto, a grau pelo qual as diferentes partes da planta e seus tecidos lignificam varia grandemente (WILSON, 1993). Esta diferença específica a cada tecido na lignificação pode ser responsável pela baixa correlação entre concentração de lignina e digestibilidade da parede celular de amostras de forragens com maturidade similar (JUNG; CASLER, 2006).

A escolha da cultivar é uma das decisões de manejo mais importantes na elaboração da silagem, sendo que uma escolha correta pode freqüentemente significar a diferença entre lucro e prejuízo. O objetivo com este trabalho foi avaliar o efeito da idade de corte sobre a qualidade nutricional do colmo de genótipos de milho, permitindo a seleção de materiais de

melhor qualidade, com o intuito de definir critérios de seleção em programas de melhoramento de híbridos de milho para ensilagem, visando o aumento da digestibilidade da fibra do colmo. Objetivou-se ainda a classificação das cultivares em grupos de acordo com suas características produtivas e de qualidade do colmo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Descrição do local

O Experimento foi conduzido em área do Instituto Agrônomo de Campinas, localizado em Campinas, região sudeste do estado de São Paulo (latitude 22° 54' S e longitude 47° 03' W). A Altitude local é de 600 m e o clima, segundo a classificação do Instituto Nacional de Meteorologia–INMET é do tipo subtropical, com chuvas de verão e inverno relativamente seco. A média anual de precipitação pluviométrica é 1249,4 mm e as temperaturas médias são: máxima 29,26°, mínima: 18,14° e 60-80% de umidade relativa. O estabelecimento da cultura foi realizado em uma área plana de solo latossolo vermelho distroférrico.

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 - Condições climáticas durante o experimento

Período	Temperatura média (°C)	Evapotranspiração potencial (mm/dia)	Precipitação acumulada (mm)
10/11/2005 a 15/01/2005	23,8	15,1	304,7
16/01/2006 a 15/02/2006	25,4	16,9	299,5
16/02/2006 a 19/03/2006	25,1	14,6	139,7

Quinze híbridos de milho foram semeados no dia 09 de novembro de 2005, adubados com 250 kg/ha da fórmula de 8-28-16 (N-P-K) no momento do plantio e realizou-se também uma adubação em cobertura com 100 kg/ha de N na forma de uréia.

Foram avaliados 12 híbridos experimentais top crosses, IA 33 X HC 1-2-1; IA 33 X HC

2-6-2; IA 33 X HC 2-8-2; IA 33 X HC 3-2-1; IA 33 X HC 7-12-1; IA 33 X HC 9-14-1; IA 33 X HC 10-3-1; IA 33 X HC 12-3-1; IA 33 X HC 12-6-1; IA 33 X HC 13-1-1; IA 33 X HC 13-28-1; mais o testador IA33 e duas testemunhas comerciais, DKB 350 e IAC 8333, totalizando 15 tratamentos testados sob delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições.

As parcelas experimentais eram formadas por 4 linhas espaçadas de 0,8 m por 5 m de comprimento, em um total de 25 plantas por linha. Os híbridos foram colhidos após 90, 120 e 150 dias de crescimento. A 1ª coleta foi nos dias 16 e 17 de janeiro, a 2ª coleta nos dias 16 e 17 de fevereiro e a 3ª coleta nos dias 20 e 21 de março.

A cada data de corte, 4 plantas inteiras foram cortadas rente ao solo e separadas nas frações folhas, colmos e espigas. O 4º e 5º internódios do colmo foram coletados para determinação da composição química e digestibilidade *in vitro*. As amostras foram secas em estufa com ventilação forçada de ar a 55°C por 72 horas. Após moagem em moinho munido com peneira de 1 mm, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro.

Análises Laboratoriais

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de bromatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP no *Campus* Pirassununga-SP. Os parâmetros analisados foram os teores de matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina e digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e da FDN (DIVFDN). Os teores de FDN, FDA, lignina, DIVMS e DIVFDN foram determinados conformes Goering e Van Soest (1970).

Após secagem em estufa a 55°C por 72 h, amostras do 4º e 5º internódio foi moído a 1 mm e incubado, em duplicata, por 30 h a 39°C em solução de MacDougall e líquido ruminal. O fluido ruminal foi coletado de três vacas mantidas a pasto recebendo suplementação mineral. As amostras foram incubadas por 30 horas a 39°C em estufa de temperatura controlada. Durante este tempo, os frascos foram agitados três vezes por dia. Ao final do período de incubação, os frascos foram removidos da estufa, adicionou-se 20 mL de solução detergente neutro e foram mantidos estocados a -20°C para análise posterior do teor de FDN segundo Goering e Van Soest (1970). O teor de FDN da solução foi determinado segundo metodologia descrita anteriormente. O teor de MS a 105°C foi determinado para cálculo da DIVMS, DIVFDN.

Análise Estatística

Foi considerado um delineamento de blocos ao acaso com parcela sub-dividida, aonde as idades de corte eram as parcelas e os genótipos as sub-parcelas. A análise estatística foi feita utilizando-se o procedimento "MIXED" do pacote estatístico SAS (2000), considerando-se os efeitos fixos de genótipo, maturidade, internódio e as interações entre os três, e os efeitos aleatórios de bloco. Foi realizado o teste t protegido por Fisher para comparação das médias. Foi feita ainda uma análise de agrupamento dos genótipos segundo o método de Tocher, utilizando a matriz de distâncias euclidiana média (CRUZ et al., 1997).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de Massa, Teor de matéria seca e proporções da planta de milho

O ponto de maturidade à colheita é um fator de grande impacto sobre o valor nutritivo da silagem (JOHNSON et al., 1999). Durante o desenvolvimento dos híbridos de milho, houve aumento quadrático na produção de MS, % de espigas e teor de MS da planta toda (Tabela 2). De maneira inversa, houve um decréscimo quadrático na proporção de colmos e folhas (Tabela 2).

Tabela 2 - Produção de massa, composição e teor de matéria seca de 15 híbridos de milho colhidos em três estádios de maturidade

Variável	Idade, dias			EPM ¹	Nível de significância	
	90	120	150		linear	quadrático
PMS ² , t/ha	5,9	16,5	21,0	352	**	**
Espiga, %MS	4,6	47,2	58,4	0,6	**	**
Colmo, %MS	50,1	33,5	27,0	0,6	**	**
Folha, %MS	45,3	19,3	14,6	0,5	**	**
MS, %	14,7	25,2	44,7	0,3	**	**

¹Erro padrão da média. ²Produção total de matéria seca. **Significativo a 1% de probabilidade.

Conforme o modelo quadrático encontrado ($\%MS = 36,7 - 0,7*Idade + 0,005*Idade^2$, $R^2=0,94\%$), os híbridos atingiram o teor de umidade recomendado para corte (32% de MS, COX; CHERNEY, 2005) com 132 dias após o plantio, sendo que após este ponto houve uma perda de 0,7% de umidade a cada dia. Isto significa que a janela para corte na umidade

recomendada (32-35% de MS, COX; CHERNEY, 2005) foi de apenas seis dias. Estudando quatro híbridos durante quatro anos, Ma et al. (2006) relatam uma janela de corte de 8 dias para colheita dos híbridos entre 30 e 38% de MS.

De acordo com o modelo quadrático encontrado ($PMS\text{ kg/ha} = -62913 + 1073 \cdot \text{Idade} - 3,4 \cdot \text{Idade}^2$, $R^2=77,7\%$), houve um acréscimo de 110 kg de MS/ha por dia entre os teores de 32 e 45% de MS; ou seja, colhendo-se as plantas com 32% ao invés de 45% de MS, haveria uma perda de produtividade de 1.900 kg MS/ha, o que corresponde a 90% da produção máxima. Este resultado está de acordo com as recomendações de ponto ótimo de colheita com produtividade $\geq 85\%$ da produtividade máxima (COX; CHERNEY, 2005).

Houve diferença entre os genótipos quanto à % de MS da planta e produção total (PMS) quando colhidos com 90, 120 e 150 dias (Tabela 3). O teor de MS com 120 dias de crescimento variou de 23,1 a 27,5%, e a PMS de 12,0 a 17,2 t/ha (Tabela 3).

Tabela 3 - Teor de MS e produção total de matéria seca de 15 genótipos de milho colhidos em três idades de corte

Genótipos	MS 65°C, %			PMS ¹ , t/ha		
	90 d	120 d	150 d	90 d	120 d	150 d
IA33 X HC1-2-1	13,2 ^c	24,6 ^{defg}	44,2 ^{abcde}	5,6 ^{bcdef}	15,5 ^b	22,1 ^{bcd}
IA33 X HC2-6-2	14,2 ^{bc}	25,7 ^{bcde}	45,0 ^{abcd}	5,3 ^{cdef}	16,6 ^b	19,6 ^{de}
IA33 X HC2-8-2	14,3 ^{bc}	23,8 ^{fgh}	45,4 ^{abc}	6,0 ^{abcd}	16,1 ^b	15,0 ^f
IA33 X HC3-2-1	14,6 ^{bc}	25,8 ^{abcde}	39,4 ^e	6,1 ^{abc}	20,8 ^a	22,1 ^{bcd}
IA33 X HC4-9-1	13,9 ^{bc}	26,9 ^{abc}	46,8 ^{abc}	5,2 ^{def}	16,2 ^b	20,9 ^{cde}
IA33 X HC7-12-1	15,1 ^b	26,3 ^{abcd}	49,5 ^a	6,4 ^{ab}	16,9 ^b	29,4 ^a
IA33 X HC9-14-1	14,3 ^{bc}	27,5 ^a	44,5 ^{abcd}	6,0 ^{abcd}	20,6 ^a	22,0 ^{bcd}
IA33 X HC10-3-1	14,6 ^{bc}	24,2 ^{efgh}	45,7 ^{abc}	6,1 ^{abc}	15,8 ^b	17,6 ^{ef}
IA33 X HC12-3-1	14,9 ^b	25,3 ^{bcdef}	42,3 ^{cde}	4,8 ^f	14,4 ^{bc}	18,4 ^{def}
IA33 X HC12-6-1	14,0 ^{bc}	22,7 ^h	40,5 ^{de}	5,9 ^{abcd}	17,2 ^b	24,2 ^{bc}
IA33 X HC13-1-1	14,3 ^{bc}	27,0 ^{ab}	45,1 ^{abcd}	5,9 ^{abcde}	16,8 ^b	18,5 ^{def}
IA33 X HC13-28-1	15,1 ^b	25,2 ^{cdef}	43,4 ^{bcde}	6,6 ^a	15,3 ^{bc}	25,3 ^{ab}
IAC 8333	15,0 ^b	23,1 ^{gh}	46,1 ^{abc}	6,8 ^a	16,0 ^b	17,5 ^{ef}
IA 33	14,5 ^{bc}	24,1 ^{efgh}	45,8 ^{abc}	5,0 ^{ef}	12,0 ^c	19,6 ^{de}
DKB 350	18,0 ^a	25,7 ^{bcde}	47,8 ^{ab}	6,4 ^{ab}	16,6 ^b	23,8 ^{bc}
Média	14,7 ^A	25,2 ^B	44,8 ^C	5,9 ^A	16,5 ^B	21,0 ^C
EPM ²	0,9	1,0	2,3	0,6	1,2	1,8
Significância Genótipo ³	**	**	*	**	**	**

¹Produção de matéria seca verde, em t/ha. ²EPM: Erro padrão da média. ³Probabilidade de efeito significativo de genótipo (Teste-F). Esses são classificados como: ns: não significativo; *P<0,05; **P<0,01. ^{abcde} Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste-t protegido por Fisher. ^{ABC} Médias na mesma linha seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste-t protegido por Fisher.

Os dados obtidos por Beleze et al. (2003b), que avaliaram cinco híbridos de milho na região sul do Estado do Paraná, foram muito próximos aos resultados deste trabalho para a PMS, obtendo uma variação de 17,24 a 15,14 t/ha. Melo (1999) avaliou 30 cultivares de milho na região de Lavras-MG e obteve resultados que tiveram variação máxima e mínima, respectivamente, em relação à produção de matéria seca de 20,59 e 12,49 t/ha aos 110 dias.

Rossi Junior et al. (2006) testaram dois cultivares de milho cortados em diferentes alturas e colhidos com 120 dias e obtiveram valores mais elevados de MS, que variaram de 27,3 a 35%. Zopollatto (2007), no estado de São Paulo, avaliou seis híbridos de milho para silagem e também verificou valores maiores de teor de MS aos 120 dias, que variaram de 42,7 a 29,8%. Oliveira et al. (2007) avaliaram 8 variedades de milho e três de sorgo na região de Patos de Minas-MG e obtiveram variabilidade na PMS de 15,5 a 22,7 t/ha, e concluíram que o aumento da PMS resulta na redução do custo de produção da silagem de milho.

Observa-se que com o avanço da maturidade há aumento na proporção de espiga passando de 4,6% para 58,5% aos 90 e 150 dias, respectivamente. Ao contrário, as proporções de folha e colmo tiveram queda ao longo do tempo (Tabela 4).

Zopollatto (2007) obteve médias semelhantes para as frações de espiga (47%), folha (18%) e colmo (34%) aos 120 dias de idade, em relação aquelas obtidas no presente trabalho. Caetano (2001) estudou 11 genótipos de milho colhido a duas alturas de corte, baixa e alta. Os cultivares pertencentes ao grupo de corte baixo obtiveram médias superiores às proporções de espiga (70%), inferiores na proporção de folha (11%) e semelhantes na proporção de colmo (19%), comparado à idade de 120 dias.

Observou-se variação significativa entre os genótipos de milho em relação ao percentual de participação das frações espiga, folha e colmo nas três idades de corte (Tabela 4). Entre as diferenças mais expressivas, na idade de 120 dias, pode-se notar que o genótipo IA33 X HC13-28-1 apresentou a maior proporção de colmo e folha e a menor proporção de espiga. No extremo oposto, o genótipo IA33 X HC9-14-1 apresentou menor proporções de colmo, folha e maior proporções de espiga.

Tabela 4 - Proporção de espigas, folhas e colmos de 15 genótipos de milho colhidos em três idades de corte

Genótipos	Espigas, %MS			Folhas, %MS			Colmo, %MS		
	90 d	120 d	150 d	90 d	120 d	150 d	90 d	120 d	150 d
IA33 X HC1-2-1	3,1 ^{efg}	43,7 ^{def}	60,2 ^{abc}	39,6 ^{efg}	19,2 ^{bcd}	13,2 ^{def}	57,3 ^{ab}	37,1 ^b	26,6 ^{bcd}
IA33 X HC2-6-2	0,8 ^g	48,7 ^{bc}	56,6 ^{bcd}	46,3 ^{abc}	19,7 ^{bcd}	17,7 ^a	52,9 ^{abc}	31,6 ^{cde}	25,7 ^{bcd}
IA33 X HC2-8-2	6,0 ^{bcde}	43,4 ^{def}	57,4 ^{bcd}	48,8 ^{abc}	22,3 ^a	17,4 ^{ab}	45,2 ^e	34,2 ^{bcd}	25,2 ^{cde}
IA33 X HC3-2-1	3,6 ^{cdefg}	49,6 ^{ab}	52,9 ^d	50,4 ^{ab}	19,7 ^{bcd}	16,5 ^{abc}	45,9 ^{de}	30,7 ^{de}	30,6 ^{ab}
IA33 X HC4-9-1	6,8 ^{bc}	48,8 ^{bc}	62,8 ^{ab}	40,5 ^{defg}	20,3 ^{abc}	13,3 ^{def}	52,6 ^{bc}	30,9 ^{cde}	23,9 ^{de}
IA33 X HC7-12-1	3,4 ^{defg}	48,3 ^{bc}	65,2 ^a	38,6 ^{fg}	18,6 ^{cd}	11,4 ^f	58,0 ^a	33,1 ^{bcd}	23,5 ^{de}
IA33 X HC9-14-1	6,5 ^{bcd}	53,8 ^a	60,4 ^{abc}	35,9 ^g	15,7 ^e	12,1 ^f	57,6 ^{ab}	30,5 ^{de}	27,4 ^{bcd}
IA33 X HC10-3-1	4,9 ^{bcdef}	50,9 ^{ab}	57,8 ^{abcd}	45,1 ^{bcde}	20,2 ^{abcd}	16,7 ^{abc}	50,0 ^{cde}	28,9 ^e	25,6 ^{cde}
IA33 X HC12-3-1	5,0 ^{bcdef}	47,1 ^{bcd}	58,0 ^{abcd}	45,5 ^{bcd}	18,0 ^{de}	12,7 ^{ef}	49,5 ^{cde}	35,0 ^{bc}	29,3 ^{abc}
IA33 X HC12-6-1	1,3 ^g	45,0 ^{cde}	57,8 ^{abcd}	51,5 ^a	19,0 ^{cd}	14,8 ^{bcd}	47,1 ^{de}	36,0 ^b	27,4 ^{bcd}
IA33 X HC13-1-1	2,8 ^{efg}	48,5 ^{bc}	55,5 ^{cd}	46,4 ^{abc}	18,6 ^{cd}	14,4 ^{cdef}	50,7 ^{cd}	32,9 ^{bcd}	30,1 ^{abc}
IA33 X HC13-28-1	3,8 ^{cdefg}	40,4 ^f	52,6 ^d	43,5 ^{cdef}	18,2 ^{cd}	14,9 ^{bcd}	52,6 ^{bc}	41,4 ^a	32,5 ^a
IAC 8333	7,9 ^{ab}	47,2 ^{bcd}	56,4 ^{bcd}	47,2 ^{abc}	18,9 ^{cd}	14,4 ^{cdef}	45,0 ^e	33,9 ^{bcd}	29,2 ^{abc}
IA 33	2,4 ^{fg}	42,1 ^{ef}	63,0 ^{ab}	49,5 ^{ab}	21,4 ^{ab}	15,5 ^{abcd}	48,1 ^{cde}	36,5 ^b	21,4 ^e
DKB 350	11,0 ^a	50,4 ^{ab}	61,0 ^{abc}	50,6 ^{ab}	19,1 ^{bcd}	12,6 ^{ef}	38,4 ^f	30,4 ^{de}	26,4 ^{bcd}
Média	4,6 ^A	47,2 ^B	58,5 ^C	45,3 ^A	19,2 ^B	14,5 ^C	50,1 ^A	33,5 ^B	27,0 ^C
EPM ²	1,7	1,7	3,2	2,0	0,9	1,2	2,2	1,6	2,5
Significância Genótipo ³	*	**	*	**	**	**	**	**	**

¹Produção de matéria seca verde, em t/ha. ²EPM: Erro padrão da média. ³Probabilidade de efeito significativo de genótipo (Teste-F). Esses são classificados como: ns: não significativo; *P<0,05; **P<0,01. ^{abcde} Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste-t protegido por Fisher. ^{ABC} Médias na mesma linha seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste-t protegido por Fisher.

Efeito de maturidade sobre a composição do 4º e 5º internódios do colmo

Não houve efeito de maturidade ou interação internódio x maturidade sobre o comprimento ou diâmetro dos dois internódios colhidos (Tabela 5). Estes dados corroboram com resultados anteriores que apontam que a elongação e espessamento do colmo do milho se completa no final do estágio vegetativo, com aproximadamente 80 dias após emergência (JUNG, 2003). O 5º internódio apresentou maior comprimento médio (16,5 versus 14,7 cm) e menor diâmetro médio (2,2 versus 2,3 cm) do que o 4º internódio (Tabela 5).

Tabela 5 - Morfologia, composição bromatológica e digestibilidade *in vitro* do 4º e 5º internódios do colmo de 15 híbridos de milho colhidos em três estádios de maturidade – Efeito geral de maturidade, internódio e interação

Variável	Idade, dias						EPM ¹	Probabilidade ²		
	90		120		150			M	I	M*I
	4ºInt	5ºInt	4ºInt	5ºInt	4ºInt	5ºInt				
Comprimento, cm	14,8	17,0	14,5	16,2	14,7	16,3	0,26	ns	**	ns
Diâmetro, cm	2,33	2,19	2,32	2,21	2,25	2,16	0,04	ns	**	ns
FDN, %MS	69,0	72,2	68,5	69,1	63,0	63,0	0,69	*	*	ns
FDA, %MS	41,8	42,4	44,0	44,0	41,5	40,4	0,64	**	ns	ns
Lignina, %MS	4,8	4,6	6,5	7,0	7,8	7,9	0,16	**	ns	ns
Lignina, %FDN	6,9	6,4	9,4	10,1	12,3	12,6	0,20	**	ns	*
DIVMS ³ , %MS	52	47	50	49	52	54	1,1	ns	ns	*
DIVFDN ⁴ , %FDN	31	26	28	26	24	27	1,4	ns	ns	*

¹Erro padrão da média. ²Probabilidades estatísticas para efeito de maturidade (M), internódio (I) e interação entre maturidade e internódio (MxI). ³Digestibilidade *in vitro* da MS. ⁴Digestibilidade *in vitro* da FDN. ^{ns}Não-significativo. * e **Significativo a 5% e a 1% de probabilidade, respectivamente.

Quanto ao teor de parede celular, houve efeito significativo da maturidade e do internódio sobre o valor de FDN do colmo de híbridos de milho, porém não houve interação significativa maturidade x internódio (Tabela 5). Houve queda no teor de FDN em ambos os internódios com o avanço da maturidade, passando de 70,6% da MS com 90 dias para 63,0 % da MS com 150 dias de desenvolvimento (Tabela 5). O teor de FDN médio foi maior no 5º do que no 4º internódio (68,1 versus 66,8 %, Tabela 5).

Como demonstrado acima, a maturidade afeta diferentemente a qualidade do 4º e do 5º internódio. Da mesma maneira é importante determinar se existe variação entre os genótipos quanto aos efeitos da maturidade sobre a qualidade do 4º e 5º internódio do colmo. Para todas as variáveis analisadas, houve efeito significativo da interação Internódio x Genótipo em pelo menos uma idade de corte, o que demonstra que os dados dos dois internódios não podem ser

apresentados como média de 4º+5º internódio, mas sim analisados separadamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Morfologia, composição bromatológica e digestibilidade *in vitro* do 4º e 5º internódios do colmo de 15 híbridos de milho colhidos em três estádios de maturidade - Efeito de internódio dentro de maturidade e interação internódio*genótipo

Parâmetro	Dias de crescimento ¹	4º Int	5º Int	EPM ²	Probabilidade ³	
					I(M)	I*G
Comprimento, cm	90	14,8 ^b	17,0 ^a	0,2	**	**
	120	14,5 ^b	16,2 ^a	0,2	**	**
	150	14,6 ^b	16,2 ^a	0,2	**	**
Diâmetro, cm	90	2,33 ^a	2,19 ^b	0,04	*	ns
	120	2,32	2,21	0,04	ns	ns
	150	2,25	2,17	0,05	ns	**
FDN, %MS	90	69,0	72,2	1,2	ns	ns
	120	68,5	69,1	1,2	ns	**
	150	63,2	63,2	1,2	ns	**
FDA, %MS	90	41,8	42,4	0,6	ns	ns
	120	44,0	44,0	0,6	ns	ns
	150	41,6	40,6	0,6	ns	**
Lignina, %FDN	90	6,9	6,4	0,3	ns	ns
	120	9,4	10,1	0,3	ns	*
	150	12,3	12,6	0,3	ns	**
DIVMS ¹ , %MS	90	51,7	46,8	2,6	ns	**
	120	50,4	49,2	2,6	ns	*
	150	51,8	53,7	2,6	ns	*
DIVFDN ² , %FDN	90	30,5	26,2	3,8	ns	**
	120	27,7	26,5	3,8	ns	ns
	150	23,7	26,7	3,8	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. ³Probabilidades estatísticas para efeito de internódio dentro de cada idade I(M), e interação entre internódio e genótipo dentro de cada estágio de maturidade (I*G). ¹DIVMS: Digestibilidade *in vitro* da matéria seca. ²DIVFDN: Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro. ^{ab}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si.

Diferentemente das demais forragens, normalmente não há aumento do teor de FDN da planta toda de milho com o avanço da maturidade, podendo inclusive ocorrer redução no teor total de FDN (JOHNSON et al., 2002). Esta queda no valor total de FDN com o avanço da maturidade pode ser explicada pelo acúmulo de amido (FILYA, 2004). A translocação de nutrientes da parte aérea para os grãos (FERREIRA, 2001) pode acarretar em aumento do teor de FDN, FDA e lignina do colmo com o avanço da maturidade, como observado por Estrada-Flores et al. (2006) e Masoero et al. (2006).

No entanto, no presente estudo, o teor de FDN do 4º e 5º internódios foi reduzido com o avanço da maturidade, possivelmente devido ao armazenamento de sucrose e amido (JUNG; CASLER, 2006). O mesmo resultado foi observado em experimento anterior (SILVA et al., 2008).

Estudando o 4º internódio do colmo de três híbridos de milho, Jung e Casler (2006) relatam que houve aumento no teor de parede celular do 4º internódio até 66 dias após o plantio, sendo que após este ponto houve redução no teor de parede celular com o avanço da maturidade. Zeoula et al. (2003a) relatam que não houve mudança nos teores de FDN, FDA e lignina do colmo de híbridos de milho com o avanço da maturidade. Seria vantajoso aos fazendeiros utilizarem híbridos de milho com aumento lento do teor de FDN do colmo, o que permitiria uma maior flexibilidade do tempo de colheita.

Não houve diferença entre os internódios quanto ao teor de FDA (Tabela 5), sendo observado um comportamento quadrático do teor de FDA dos internódios com o avanço da maturidade, com valores médios de 42,1, 44 e 40,9% da MS para 90, 120 e 150 dias de crescimento, respectivamente (Tabela 5).

Não houve diferença entre os internódios quanto ao teor de lignina na MS (Tabela 5). A lignina apresentou um aumento quadrático com o avanço da maturidade, com valores médios de 4,7, 6,7 e 7,8% da MS para 90, 120 e 150 dias de crescimento, respectivamente (Tabela 5). No entanto, quando o teor de lignina foi expresso como porcentagem do FDN, houve uma interação significativa internódio x idade (Tabela 5).

Com relação ao colmo do milho, os componentes da parede celular são depositados na direção acrópeta, mais fortemente nos internódios mais velhos e mais baixos (MORRISON; BUXTON, 1993). Assim, seria de se esperar maiores concentrações de FDN e de lignina no 4º do que no 5º internódio. Porém não houve diferença entre os teores médios de lignina entre os internódios (Tabela 5). O 5º internódio apresentou maior concentração de lignina no FDN, quando colhido com 120 dias de crescimento (10,1 versus 9,4% FDN), do que o 4º internódio, sendo que com 90 ou 150 dias o teor de lignina foi igual entre os dois internódios (Tabela 5). Morrison et al. (1998) e Jung (2003) demonstraram que além de haver diferença na deposição de lignina entre os internódios do colmo do milho, existe grande diferença também na síntese de ácido ferúlico e ácido p-cumárico, que são responsáveis pela ligação entre a lignina e os carboidratos da parede celular, prejudicando a digestibilidade dos mesmos.

Houve interação internódio x idade significativa para a DIVMS e DIVFDN do colmo do milho. O avanço da maturidade promoveu um aumento linear na DIVMS do 5º internódio, enquanto não exerceu efeito sobre a DIVMS do 4º internódio (Tabela 5). Com 90 dias de

crescimento, o 4º internódio apresentava maior DIVMS do que o 5º internódio, sendo que com 120 e 150 dias de crescimento não houve diferença (Tabela 6).

Para a DIVFDN o efeito foi inverso, o aumento da maturidade promoveu queda linear na DIVFDN do 4º internódio, enquanto não exerceu efeito sobre a DIVFDN do 5º internódio. Com 90 dias de crescimento, o 4º internódio apresentava maior DIVFDN do que o 5º internódio, sendo que com 120 e 150 dias de crescimento não houve diferença (Tabela 6).

Estudando o efeito da maturidade sobre a digestibilidade do colmo do milho, Masoero et al. (2006) observaram queda nos valores de DIVMS e DIVFDN do colmo, o mesmo reportado por Estrada-Flores et al. (2006).

Efeito de genótipos sobre a composição do 4º e 5º internódios do colmo

Analisando-se a composição bromatológica do 4º internódio do colmo, o valor médio deferiu entre os genótipos, nas três idades de corte, quanto à % de FDN (Tabela 7). O maior teor de FDN foi verificado com o genótipo DKB 350 (74,3%), na idade de 120 dias, ao contrario do genótipo IAC 8333 (63,9%) que apresentou menores valores. O teor de Lignina, %FDN, na idade de 150 dias foi mais elevado no genótipo DKB 350 (12,8%) quando comparado ao genótipo IA 33 (11,8%). Não foi encontrada diferença significativa, ao longo das três idades de corte, no teor de FDA (Tabela 7), confirmando assim que o uso da FDA para cálculo de digestibilidade dos alimentos, não possui base teórica sólida, mas somente associação estatística (VAN SOEST, 1994).

Zeoula et al. (2003a) estudando 5 híbridos de milho em diferentes estádios de maturação na região sul do Estado do Paraná, não obteve variabilidade no teor de FDN, FDA e lignina da fração colmo + bainha. Silva et al. (1999), avaliando a concentração de FDN no colmo + folha, encontraram valores que variaram entre 55,03 a 67,42%, para híbridos de milho no ano de 1995/96 e entre 61,05 a 71,18% de FDN, no ano de 1996/97.

Tabela 7 - Composição bromatológica do 4º Internódio do colmo de 15 genótipos de milho colhidos em três idades de corte

Genótipos	FDN ¹ , % MS			FDA ² , %MS			Lignina, %FDN		
	90 d	120 d	150 d	90 d	120 d	150 d	90 d	120 d	150 d
IA33 X HC1-2-1	71,5 ^{abc}	71,9 ^{ab}	61,8 ^{bcde}	42,6	47,1	36,9	6,3	8,4	10,3 ^{bcde}
IA33 X HC2-6-2	73,6 ^a	72,2 ^{ab}	68,5 ^{abc}	45,5	46,8	47,4	6,7	9,8	13,4 ^{abcd}
IA33 X HC2-8-2	67,3 ^{cde}	72,3 ^{ab}	69,7 ^{ab}	41,0	44,4	44,5	5,9	9,5	10,8 ^{de}
IA33 X HC3-2-1	71,2 ^{abcd}	70,0 ^{abc}	58,9 ^{de}	35,9	44,5	40,1	7,8	9,3	13,9 ^{ab}
IA33 X HC4-9-1	72,5 ^{ab}	65,6 ^{cd}	65,8 ^{abcd}	45,8	43,5	42,0	7,0	10,2	12,9 ^{abc}
IA33 X HC7-12-1	68,9 ^{bcd}	64,7 ^{cd}	73,3 ^a	43,0	42,5	49,7	6,9	9,1	11,9 ^{abc}
IA33 X HC9-14-1	69,3 ^{abcd}	70,0 ^{abc}	62,1 ^{bcde}	41,8	44,4	41,3	7,6	9,7	13,7 ^{abc}
IA33 X HC10-3-1	70,0 ^{abcd}	68,7 ^{abcd}	61,0 ^{cde}	43,8	44,7	39,0	6,6	9,6	12,3 ^{abcd}
IA33 X HC12-3-1	63,1 ^e	64,2 ^{cd}	65,7 ^{abcd}	39,6	41,7	44,3	8,6	9,7	12,7 ^a
IA33 X HC12-6-1	69,2 ^{abcd}	69,3 ^{abcd}	61,2 ^{cde}	42,3	42,8	43,7	6,1	9,2	12,9 ^{cde}
IA33 X HC13-1-1	67,5 ^{cde}	67,9 ^{bcd}	60,6 ^{cde}	39,1	43,4	39,7	6,2	8,8	12,8 ^{cde}
IA33 X HC13-28-1	66,7 ^{de}	67,8 ^{bcd}	61,0 ^{cde}	40,3	44,0	39,9	6,4	9,1	11,5 ^{abcde}
IAC 8333	66,7 ^{de}	63,9 ^d	59,7 ^{de}	40,1	40,2	38,6	6,8	9,0	11,1 ^{abc}
IA 33	67,5 ^{cde}	65,2 ^{cd}	62,2 ^{bcde}	41,5	41,2	40,6	5,8	10,2	11,8 ^e
DKB 350	70,5 ^{abcd}	74,3 ^a	56,8 ^e	44,6	48,2	36,9	8,5	9,7	12,8 ^a
Média	69,0 ^A	68,5 ^B	63,2 ^C	41,8 ^A	44,0 ^A	41,6 ^A	6,9 ^A	9,4 ^B	12,3 ^C
EPM ³	1,7	2,2	3,8	3,4	1,9	3,8	0,8	0,4	0,8
Significância Genótipo ⁴	*	*	**	ns	ns	ns	ns	ns	**

¹Fibra em detergente neutro. ²Fibra em detergente ácido. ³Erro padrão da média. ⁴Probabilidade de efeito significativo de genótipo (Teste-F). ^{ns} não significativo; *P<0,05; **P<0,01. ^{abcde} Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste-t protegido por Fisher. ^{ABC} Médias na mesma linha seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste-t protegido por Fisher.

Analisando-se a composição bromatológica do 5º internódio do colmo, observou-se efeito significativo da maturidade sobre os valores médios de FDN, FDA e lignina (Tabela 8). Houve efeito de genótipo sobre o teor de FDN do 5º internódio nas três idades de corte, porém os teores de FDA e de lignina (%FDN) só diferiram entre os genótipos quando colhidos com 150 dias de crescimento (Tabela 8).

A digestibilidade da parede celular é um dos principais limitadores do desempenho de animais ruminantes em países tropicais (ZEOULA et al., 2003b). Assim, é importante a seleção de novas forrageiras que possuam maior digestibilidade da FDN e que mantenham alta digestibilidade da FDN mesmo em estádios avançados de maturidade.

Na tabela 9 observa-se efeito significativo da maturidade sobre o teor médio da DIVFDN do 4º internódio, passando de 30,5% para 23,7% aos 90 e 150 dias, respectivamente. Não houve efeito de maturidade sobre os valores médios de DIVMS do 4º internódio do colmo (Tabela 9).

Observou-se a existência de variabilidade genética quanto a DIVMS e a DIVFDN dos 15 genótipos avaliados, somente quando colhidos com 90 dias, não houve diferença entre os genótipos quanto a DIVFDN do 4º internódio (Tabela 9), provavelmente devido a grande variação (EPM) encontrada.

A maturidade afetou a digestibilidade do 5º internódio do colmo de maneira distinta do que o 4º internódio. Houve aumento da DIVMS do 5º internódio com avanço da maturidade, e não houve efeito da maturidade sobre o valor médio de DIVFDN do 5º internódio (Tabela 10)

Houve variabilidade genética para a DIVMS do 5º internódio nas três idades de corte, e para DIVFDN somente quando colhidos com 120 dias de crescimento (Tabela 10).

Tabela 8 - Composição bromatológica do 5º Internódio do colmo de 15 genótipos de milho colhidos em três idades de corte

Genótipos	FDN ¹ , % MS			FDA ² , %MS			Lignina, %FDN		
	90 d	120 d	150 d	90 d	120 d	150 d	90 d	120 d	150 d
IA33 X HC1-2-1	74,6 ^{ab}	70,5 ^{abc}	60,5 ^{def}	46,2	43,8	39,2 ^{cde}	6,1	7,2	11,1 ^{ef}
IA33 X HC2-6-2	75,8 ^a	73,6 ^{ab}	68,3 ^{abcd}	43,1	47,8	44,2 ^{abc}	6,2	11,3	13,7 ^{abc}
IA33 X HC2-8-2	68,8 ^{cd}	70,4 ^{abc}	69,4 ^{ab}	38,9	44,5	45,5 ^{ab}	5,4	10,7	12,5 ^{bcd}
IA33 X HC3-2-1	74,3 ^{ab}	70,5 ^{abc}	58,8 ^{ef}	45,5	45,3	38,9 ^{cde}	7,0	11,5	15,4 ^a
IA33 X HC4-9-1	74,4 ^{ab}	66,9 ^c	69,1 ^{abc}	44,3	44,4	43,1 ^{abcd}	6,2	10,9	12,3 ^{bcd}
IA33 X HC7-12-1	71,1 ^{abcd}	66,8 ^c	74,0 ^a	42,3	42,0	49,8 ^a	6,7	10,4	12,9 ^{bcd}
IA33 X HC9-14-1	71,9 ^{abcd}	69,9 ^{abc}	63,9 ^{bcd}	43,6	45,9	40,0 ^{bcd}	6,6	9,6	12,2 ^{cde}
IA33 X HC10-3-1	72,3 ^{abcd}	69,3 ^{bc}	59,5 ^{ef}	41,6	44,3	39,3 ^{cde}	6,8	11,0	12,9 ^{bcd}
IA33 X HC12-3-1	68,4 ^{cd}	65,4 ^c	64,4 ^{bcd}	38,5	41,4	42,8 ^{bcd}	6,2	8,8	12,5 ^{bcd}
IA33 X HC12-6-1	72,1 ^{abcd}	69,4 ^{bc}	60,9 ^{cdef}	42,0	43,8	38,1 ^{de}	6,2	10,4	14,4 ^{ab}
IA33 X HC13-1-1	72,0 ^{abcd}	68,3 ^{bc}	60,4 ^{def}	43,1	43,4	39,9 ^{bcd}	6,3	10,2	11,6 ^{cdef}
IA33 X HC13-28-1	70,3 ^{bcd}	67,4 ^c	60,6 ^{def}	40,6	42,9	38,9 ^{cde}	5,6	10,0	12,8 ^{bcd}
IAC 8333	68,1 ^d	65,4 ^c	60,7 ^{cdef}	38,8	41,0	35,8 ^e	6,8	9,7	10,0 ^f
IA 33	73,1 ^{abc}	67,2 ^c	62,1 ^{bcd}	43,5	42,2	38,8 ^{cde}	6,8	9,9	11,4 ^{def}
DKB 350	75,1 ^{ab}	75,2 ^a	55,6 ^f	44,2	47,8	34,6 ^e	6,9	10,5	13,2 ^{bcd}
Média	72,1 ^A	69,1 ^B	63,2 ^C	42,4 ^A	44,0 ^B	40,6 ^C	6,4 ^A	10,1 ^B	12,6 ^C
EPM ³	1,9	1,9	3,1	1,9	1,5	2,6	0,7	1,0	1,0
Significância Genótipo ⁴	*	*	*	ns	ns	**	ns	ns	**

¹Fibra em detergente neutro. ²Fibra em detergente ácido. ³Erro padrão da média. ⁴Probabilidade de efeito significativo de genótipo (Teste-F). ^{ns} não significativo; *P<0,05; **P<0,01. ^{abcde} Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste-t protegido por Fisher. ^{ABC} Médias na mesma linha seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste-t protegido por Fisher.

Tabela 9 - Digestibilidade *in vitro* do 4º internódio do colmo de 15 genótipos de milho colhidos em três idades

Genótipos	DIVMS ¹ , %MS			DIVFDN ² , %FDN		
	90 d	120 d	150 d	90 d	120 d	150 d
IA33 X HC1-2-1	43,2 ^d	43,7 ^f	56,3 ^{ab}	20,7	21,8 ^d	29,3 ^d
IA33 X HC2-6-2	44,2 ^{cd}	45,7 ^{def}	45,7 ^{de}	24,1	24,7 ^{cd}	20,4 ^{bcd}
IA33 X HC2-8-2	64,1 ^a	51,0 ^{abcd}	48,8 ^{cd}	47,3	32,3 ^a	26,1 ^a
IA33 X HC3-2-1	43,2 ^d	46,9 ^{cdef}	52,1 ^{abcd}	20,1	23,9 ^{cd}	18,6 ^{bcd}
IA33 X HC4-9-1	46,2 ^{bcd}	50,9 ^{abcd}	48,9 ^{bcd}	25,8	25,1 ^{bcd}	22,3 ^{bcd}
IA33 X HC7-12-1	53,9 ^{abcd}	54,7 ^{ab}	39,0 ^c	33,1	30,1 ^{abc}	16,4 ^{ab}
IA33 X HC9-14-1	56,0 ^{abcd}	46,6 ^{cdef}	52,0 ^{abcd}	36,5	23,9 ^{cd}	22,7 ^{cd}
IA33 X HC10-3-1	44,5 ^{cd}	50,7 ^{abcde}	51,6 ^{abcd}	20,8	28,3 ^{abc}	20,7 ^{abc}
IA33 X HC12-3-1	58,9 ^{ab}	56,0 ^a	51,4 ^{abcd}	38,0	31,5 ^{ab}	26,1 ^{ab}
IA33 X HC12-6-1	58,0 ^{ab}	50,2 ^{bcde}	54,0 ^{abc}	39,3	28,3 ^{abc}	24,6 ^{abc}
IA33 X HC13-1-1	57,1 ^{abc}	53,3 ^{ab}	55,5 ^{abc}	36,5	31,2 ^{ab}	26,5 ^{ab}
IA33 X HC13-28-1	52,8 ^{abcd}	51,7 ^{abc}	55,2 ^{abc}	29,7	28,8 ^{abc}	26,6 ^{ab}
IAC 8333	51,8 ^{abcd}	56,4 ^a	56,4 ^a	27,5	31,8 ^a	26,9 ^{ab}
IA 33	53,3 ^{abcd}	52,8 ^{ab}	53,1 ^{abcd}	32,6	27,4 ^{abcd}	24,7 ^{abcd}
DKB 350	47,7 ^{bcd}	44,9 ^{ef}	56,4 ^a	26,0	26,0 ^{abcd}	23,1 ^{abcd}
Média	51,7 ^A	50,4 ^A	51,8 ^A	30,5 ^A	27,7 ^{AB}	23,7 ^B
EPM ³	5,0	2,6	3,1	6,9	2,6	3,3
Significância Genótipo ⁴	*	**	*	ns	*	*

¹Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (30h). ²Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (30h). ³EPM: Erro padrão da média. ⁴Probabilidade de efeito significativo de genótipo (Teste-F). ^{ns} não significativo; *P<0,05; **P<0,01. ^{abcde} Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste-t protegido por Fisher. ^{ABC} Médias na mesma linha seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste-t protegido por Fisher.

Tabela 10 - Digestibilidade *in vitro* do 5º internódio do colmo de 15 genótipos de milho colhidos em três idades

Genótipos	DIVMS ¹ , %MS			DIVFDN ² , %FDN		
	90 d	120 d	150 d	90 d	120 d	150 d
IA33 X HC1-2-1	35,9 ^d	51,4 ^{abcd}	58,0 ^{ab}	14,0	30,9 ^a	30,5
IA33 X HC2-6-2	43,2 ^{bcd}	47,0 ^{cdef}	51,0 ^{bcd}	24,8	28,1 ^{abc}	28,2
IA33 X HC2-8-2	51,4 ^{abc}	48,6 ^{bcd}	51,0 ^{bcd}	28,9	26,6 ^{abc}	29,3
IA33 X HC3-2-1	36,4 ^d	41,7 ^{ef}	54,8 ^{bc}	14,3	17,8 ^{cd}	23,2
IA33 X HC4-9-1	40,9 ^{cd}	45,1 ^{cdef}	45,6 ^d	20,0	17,8 ^{bcd}	21,0
IA33 X HC7-12-1	53,2 ^{abc}	52,7 ^{abc}	45,8 ^{cd}	34,2	29,3 ^{ab}	27,2
IA33 X HC9-14-1	45,3 ^{abcd}	40,1 ^f	51,5 ^{bcd}	23,8	14,2 ^d	24,0
IA33 X HC10-3-1	41,2 ^{cd}	50,8 ^{abcde}	52,9 ^{bcd}	18,7	29,0 ^{abc}	21,2
IA33 X HC12-3-1	49,0 ^{abcd}	58,0 ^a	54,4 ^{bc}	25,7	35,9 ^a	29,3
IA33 X HC12-6-1	57,1 ^a	47,6 ^{cdef}	54,5 ^{bc}	40,2	24,6 ^{abcd}	24,8
IA33 X HC13-1-1	44,6 ^{abcd}	48,6 ^{bcd}	55,2 ^{bc}	23,1	24,6 ^{abcd}	26,0
IA33 X HC13-28-1	47,6 ^{abcd}	51,9 ^{abcd}	56,3 ^b	24,9	28,7 ^{abc}	27,8
IAC 8333	55,2 ^{ab}	56,9 ^{ab}	57,2 ^{ab}	34,3	34,0 ^a	29,2
IA 33	50,6 ^{abc}	53,7 ^{abc}	50,0 ^{bcd}	32,1	31,1 ^a	19,3
DKB 350	51,1 ^{abc}	43,2 ^{def}	65,9 ^a	34,6	24,6 ^{abcd}	38,6
Média	46,8 ^C	49,2 ^B	53,7 ^A	26,2	26,5	26,8
EPM ³	6,1	3,6	3,8	9,0	4,8	5,3
Significância Genótipo ⁴	*	*	*	ns	*	ns

¹Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (30h). ²Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (30h). ³EPM: Erro padrão da média. ⁴Probabilidade de efeito significativo de genótipo (Teste-F). ^{ns} não significativo; *P<0,05; **P<0,01. ^{abcde} Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste-t protegido por Fisher. ^{ABC} Médias na mesma linha seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste-t protegido por Fisher.

Coefficientes de correlação do 4º e 5º internódios do colmo de milho

A DIVMS do 4º internódio do colmo dos híbridos de milho foi negativamente correlacionada com os teores de FDN, FDA e lignina ($P < 0,01$, Figura 1), enquanto a DIVFDN do 4º internódio foi negativamente correlacionada somente com os teores de lignina expresso com base na MS ou no FDN ($P < 0,01$, Figura 1). Estes resultados demonstram que a DIVMS é fortemente influenciada pelos teores de açúcares solúveis, enquanto que a digestibilidade da fibra depende somente dos teores de lignina.

O teor de FDN explicou boa parte da variação da DIVMS do 4º internódio existente entre os diferentes híbridos testados, no entanto não elucidou o efeito da maturidade, uma vez que com o avanço da maturidade ocorreu queda nos teores de FDN do 4º internódio, porém não houve mudança na DIVMS (Tabela 5). Provavelmente, a queda na DIVFDN com o avanço da maturidade compensou o aumento no teor de açúcares solúveis do 4º internódio, acarretando em manutenção da DIVMS com o avanço da maturidade.

A relação existente entre lignificação e DIVFDN já foi demonstrada anteriormente (JUNG; ALLEN, 1995). Como a lignina é um componente da parede celular, o efeito da lignina sobre a digestibilidade da forragem é tido como sendo um efeito direto na digestibilidade da fibra, e não da matéria orgânica total da forragem (VAN SOEST, 1993). A falta de correlação entre lignina expressa como % da FDN e DIVMS sugere que a DIVMS, apesar de fortemente correlacionada com o teor de lignina expressa como % da MS, não seria diretamente influenciada por ela, mas sim pelo FDN. Como o teor de FDN e de lignina estão normalmente correlacionados, pode ocorrer uma correlação indireta entre % de lignina na MS e DIVMS. Mesmo com o aumento dos teores de lignina com o avanço da maturidade, não houve mudança na DIVMS (Tabela 5).

Para o 5º internódio, houve novamente forte correlação negativa entre os teores de FDN e de FDA e a DIVMS (Figura 2). No entanto não houve correlação entre os teores de lignina e DIVFDN (Figura 2). Houve correlação positiva entre o teor de lignina na FDN e DIVMS. O que pode explicar esta inusitada correlação seria a queda no teor de FDN do 5º internódio com o avanço da maturidade, promovendo aumento da DIVMS, e aumento nos teores de lignina. Assim, o avanço da maturidade aumentou os teores de açúcares solúveis do 5º internódio sem reduzir a DIVFDN, mesmo ocorrendo um aumento nos teores de lignina na fibra

Figura 1 - Correlação entre a digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e da FDN (DIVFDN) do 4º internódio do colmo de 15 variedades de milho com parâmetros de desenvolvimento e composição bromatológica. COMP=comprimento do internódio, DIA=diâmetro do internódio, FDN=fibra em detergente neutro, FDA=fibra em detergente ácido, LIG=lignina (%MS), LIG/FDN=lignina (%FDN). * e **Significativo a 5% e a 1% de probabilidade, respectivamente

Figura 2 - Correlação entre a digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e da FDN (DIVFDN) do 5º internódio do colmo de 15 variedades de milho com parâmetros de desenvolvimento e composição bromatológica. COMP=comprimento do internódio, DIA=diâmetro do internódio, FDN=fibra em detergente neutro, FDA=fibra em detergente ácido, LIG=lignina (%MS), LIG/FDN=lignina (%FDN). * e **Significativo a 5% e a 1% de probabilidade, respectivamente.

A falta de correlação entre lignina e digestibilidade da fibra foi reportada por outros autores (JUNG; VOGEL, 1992; JUNG et al., 1994). Segundo Jung e Allen (1995), o teor de lignina seria um marcador de maturidade, porém não está suficientemente relacionado com digestibilidade da fibra para ser utilizado como critério de seleção em programas de melhoramento.

Devido ao acúmulo de açúcares solúveis no colmo do milho, houve redução do FDN e aumento da lignina com o avanço da maturidade. Esta parece ser uma característica quase que exclusiva do colmo de milho e de cana-de-açúcar, sendo que nas outras gramíneas ocorre um aumento rápido no teor de FDN com o avanço da maturidade (PALHANO; HADDAD, 1992).

Os resultados aqui apresentados corroboram com a hipótese de que a concentração de lignina não é suficiente para explicar as diferenças de digestibilidade da MS ou FDN de diferentes frações ou forragens (JUNG; ALLEN, 1995), e que a mensuração direta da digestibilidade da fibra deve ser utilizada como critério de seleção.

Classificação por grupos de genótipos de milho

Diversos autores têm utilizado técnicas de análise multivariada para avaliação de forrageiras e diversidade nutricional para silagem ao longo do tempo. Strapasson et al. (2000) utilizaram essa técnica para caracterizar acessos das espécies *Paspalum guenoarum* e *Paspalum plicatulum*. Já Azevêdo et al. (2003) utilizaram para avaliar as divergências nutricionais de variedades de cana-de-açúcar. De acordo com Cruz e Regazzi (1997) a aplicação da técnica de análise de agrupamento tem sido intensamente utilizada em áreas como ciências biológicas, medicina, geologia, ciências sociais, entre outras.

O presente estudo baseou-se na aplicação de agrupamento por otimização de Tocher utilizando a matriz de distâncias euclidiana média baseados nas variáveis PMS-120d (t/ha), Espiga-120d (% MS), DIVFDN do colmo 120d (%FDN) e DIVFDN do colmo 150d (%FDN). A análise de agrupamento separou os genótipos em 4 grupos (Tabela 11).

Tabela 11 - Grupos de genótipos de milho e média das variáveis em cada grupo

Itens	Grupos			
	I	II	III	IV
	IA33 X HC1-2-1 IA 33	IA33 X HC2-8-2 IA33 X HC12-3-1 IA33 X HC12-6-1 IA33 X HC13-1-1 IA33 X HC13-28-1 IAC 8333	IA33 X HC2-6-2 IA33 X HC4-9-1 IA33 X HC7-12-1 IA33 X HC10-3-1 DKB 350	IA33 X HC3-2-1 IA33 X HC9-14-1
Distância média intragrupo	-	1,2476	1,3029	1,9913
PMS-120d ¹ (t/ha)	13,8 ^c	16,0 ^b	16,4 ^b	20,7 ^a
Espiga-120d ² (% MS)	42,9 ^b	45,3 ^b	49,4 ^a	51,7 ^a
DIVFDN ³ do colmo 120d (%FDN)	24,6 ^b	30,6 ^a	26,8 ^b	23,9 ^b
DIVFDN ⁴ do colmo 150d (%FDN)	27,0 ^a	26,1 ^a	20,6 ^b	20,7 ^b
Coefficiente linear para DIVFDN do colmo ⁵	0,08 ^a	-0,15 ^b	-0,21 ^b	-0,11 ^{ab}

¹Produção de matéria seca com 120 dias. ²Porcentagem de espigas na MS total com 120 dias. ³Digestibilidade *in vitro* (30h) da fibra em detergente neutro do 4º internódio do colmo com 120 dias. ⁴Digestibilidade *in vitro* (30h) da fibra em detergente neutro do 4º internódio do colmo com 150 dias. ⁵Coefficiente de regressão linear de decréscimo na DIVFDN do 4º internódio do colmo de acordo com idade. ^{abc}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si.

O grupo I foi constituído por genótipos com menor produção de MS e menor proporção de espigas aos 120 dias de crescimento, porém com maior valor de DIVFDN do colmo aos 150 dias e com menor queda da DIVFDN do colmo de 120 para 150 dias (Tabela 12).

Os grupos II e II foram constituídos pelos genótipos com produtividade média aos 120 dias, separando-se pela maior proporção de espigas dos genótipos do grupo III e maior DIVFDN do colmo aos 120 e 150 dias dos genótipos do grupo II. O grupo IV foi constituído pelos genótipos com maior produtividade de massa aos 120 dias, com maior proporção de espigas aos 120 dias, porém com baixa DIVFDN do colmo aos 120 e 150 dias (Tabela 12).

A partir desta análise, as características desejáveis para a seleção de genótipos de milho para silagem se encontram no grupo II, que teve produção de matéria seca média e alta digestibilidade da FDN, comparado aos outros grupos. O grupo I teve a menor queda de DIVFDN entre 120 e 150 dias, porém a menor produção de matéria seca. Já o grupo III teve produção de matéria seca média e baixa DIVFDN nos 120 dias enquanto que, o grupo IV teve alta produção de matéria seca e alta % de espigas, porém baixa digestibilidade aos 120 dias (Tabela 11).

4.4 CONCLUSÕES

O acúmulo de açúcares no colmo de milho com o avanço da maturidade promoveu queda nos teores da FDN e aumento nos teores de lignina do 4º e 5º internódios do colmo de plantas de milho.

Ocorreu redução na DIVFDN do 4º internódio com o avanço da maturidade, enquanto que não houve efeito sobre a DIVFDN do 5º internódio, indicando que o 4º internódio do colmo pode ser utilizado como indicador da queda de digestibilidade da fibra do colmo de híbridos de milho que ocorre com o avanço da maturidade.

Com base aos parâmetros estudados, as características desejáveis para seleção de genótipos de milho para silagem se encontram no grupo II que teve produção de matéria seca média e alta digestibilidade da FDN do colmo na idade de 120 dias.

Verificou-se, entre os 15 genótipos nas três idades de corte, grande variabilidade genética para os parâmetros de qualidade, o que realça a necessidade de seleção criteriosa do material a ser utilizado para silagem e melhoramento genético.

4.5 REFERÊNCIAS

ANUALPEC: anuário da pecuária brasileira. 14. ed. São Paulo: FNP, 2007. 368 p.

AZEVEDO, J. A. G.; PEREIRA, J. C.; CARNEIRO, P. C. S.; QUEIROZ, A.C.; BARBOSA, M.H.P.; FERNANDES, A.M. RENNO, F.P. Avaliação da divergência nutricional de variedades de cana-deaçúcar (*Saccharum spp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1431-1442, 2003.

BARRIÈRE, Y.; GUILLET, C. GOFFNER, D. et al. Genetic variation of breeding strategies for improved cell wall digestibility in annual forage crops. A review. **Animal Research**, v.52, p.193-228, 2003.

BELEZE, F. R.; ZEOULA, L. M.; CECATO, U.; DIAN, P. H. M.; MARTINS, E. N.; FALCÃO, A. J. S. Avaliação de cinco híbridos de milho (*Zea mays, L.*) em diferentes estádios de maturação. 2. Concentrações dos componentes estruturais e correlações. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 538-545, 2003b.

BRITO, C. J. F. A. de; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F. C. Perfil químico da parede celular e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p.1835-1844, 2003.

COX, W. J.; CHERNEY, J. H. Timing corn forage harvest for bunker silos. **Agronomy Journal**, v. 97, p. 142-146, 2005.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 390 p.

DWYER, L. M.; STEWART, D. W.; GLENN, F. Silage yields of leafy and normal hybrids. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 53., 1998, Chicago, Il. **Proceedings...** Washington, DC.: American Seed Trade Association, 1998. p. 193-216.

ESTRADA-FLORES, J. G.; GONZÁLEZ-RONQUILLO, M.; MOULD, F. L.; ARRIAGA-JORDÁN, C. M.; CASTELÁN-ORTEGA, O. A. Chemical composition and fermentation characteristics of grain and different parts of the stover from maize land races harvested at different growing periods in two zones of central Mexico. **Animal Science**, v. 82, p. 845-852, 2006.

FERREIRA, J. J. Avaliação do teor de matéria seca do milho e do estágio de maturação adequado para silagem. In: CRUZ, J. C.; RODRIGUES, J. A. S.; FERREIRA, J. J. (Org.). **Produção e utilização da silagem de milho e sorgo**. 1. ed. Sete Lagoas - MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. p. 429-444.

FILYA, L. Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. **Animal Feed Science and Technology**, v.116, p.141-150, 2004.

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

GOMES, M. S.; PINHO, R. G. V.; RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. V. Variabilidade genética em linhagens de milho nas características relacionadas com a produtividade de silagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 879-885, 2004.

JOHNSON, L.; HARRISON, J.H.; HUNT, C. et al. Nutritive value of corn silage as affected by maturity and mechanical processing: A contemporary review. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.12, p.2813-2825, 1999.

JUNG, H. G.; ALLEN, M. S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2774-2790, 1995.

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. G.; SMITH, R. R.; ENDRES, C. S. Cell wall composition and degradability of stem tissue from lucerne divergently selected for lignin and *in vitro* dry matter disappearance. **Grass Forage Science**, v. 49, p. 295-299, 1994.

JUNG, H. G.; VOGEL, K. P. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and big bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 59, p. 769-776, 1992.

JUNG, H. J. Maize stem tissues: ferulate deposition in developing internode cell walls. **Phytochemistry**, v. 63, p. 543-549, 2003.

MA, B. L.; SUBEDI, K. D.; STEWART, D. W.; DWYER, L. M. Dry matter accumulation and silage moisture changes after silking in leafy and dual-purpose corn hybrids. **Agronomy Journal**, v. 98, p. 922-929, 2006.

MASOERO, F.; ROSSI, F.; PULIMENO, A. M. Chemical composition and *in vitro* digestibility of stalks, leaves and cobs of four corn hybrids at different phenological stages. **Italian Journal of Animal Science**, v. 5, p. 215-227, 2006.

MELO, C. M. Avaliação de cultivares de milho para produção de silagem na região de Lavras – MG. **Ciência e Agrotecnica**. Lavras, v. 23, n. 1, p. 31- 39, 1999.

MORRISON, T. A.; BUXTON, D. R. Activity of phenylalanine ammonia-lyase, tyrosine ammonia-lyase, and cinnamyl alcohol dehydrogenase in the maize stalks. **Crop Science**, v. 33, p. 1264-1268, 1993.

MORRISON, T. A.; JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. Cell wall composition of maize internodes of varying maturity. **Crop Science**, v. 38, p. 455-460, 1998.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 3, p. 589-596, 1999.

OLIVEIRA, D. R.; MENDES, F. C.; FERNANDES, L. O.; PAES, J. M. V. Avaliação de cultivares de milho e sorgo para produção de silagem em patos de minas, In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2007, Jaboticabal, UNESP. [Anais...] 2007.

PALHANO, A. L.; HADDAD, C. M. Exigências nutricionais e valor nutritivo de *Cynodon dactylon* (L.) Pers. cv. *Coast-Cross* nº1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 1429-1438, 1992.

ROSSI JUNIOR, P.; FUGISAWA, A. C.; SCHOGOR, A. L. B.; MURARO, G. B. Digestibilidade aparente de dois cultivares de milho, cortados em diferentes alturas, submetidos à ensilagem. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 58-61, 2006.

SAS. Institute Inc. **Statistical Analysis System**: user's guide. Version 8.2 ed. Cary: SAS Institute, USA, 2000.

SILVA, L. F. P.; CASSOLI, L. D.; ROMA JUNIOR, L. C.; RODRIGUES, A. C. O.; MACHADO, P. F. In situ degradability of corn stover and elephant-grass harvested at four stages of maturity. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 595-603, 2008.

SILVA, L. F. P.; MACHADO, P. F.; FRANCISCO JÚNIOR, J. C.; DONIZETTI, M. Características agrônômicas e digestibilidade "in situ" da fração volumosa de híbridos de milho para silagem. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 171-184, 1999.

STRAPASSON, E.; VENCovsky, R.; BATISTA, L. A. R. Seleção de descritores na caracterização de germoplasma de *Paspalum* sp. Por meio de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 373-381, 2000.

VAN SOEST, P. J. Cell wall matrix interactions and degradation-session synopsis. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. et al. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy, 1993. p. 377-393.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Comstock Publ. Assoc., 1994. 476 p.

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.

ZEOULA, L. M.; BELEZE, J. R. F.; CECATO, U.; JOBIM, C. C.; GERON, L. J. V.; MAEDA, E. M.; FALCÃO, A. J. S. Avaliação de cinco híbridos de milho (*Zea mays*, L.) em diferentes estádios de maturação. 3. Composição químico-bromatológica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 556-566, 2003a.

ZEOULA, L. M.; BELEZE, J. R. F.; CECATO, U.; JOBIM, C.; GERON, V. J.; PRADO, P. P.; FALCÃO, S. J. Avaliação de cinco híbridos de milho (*Zea mays*, L.) em diferentes estádios de maturação. 4. Digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e fibra em detergente neutro da porção vegetativa e planta inteira. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 567-575, 2003b.

ZOPOLLATTO, M. **Produtividade, composição morfológica e valor nutritivo de cultivares de milho (*Zea mays* L.) para produção de silagem sob efeitos da maturidade**. 2007. 105 p. Dissertação (Doutor em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

**Capítulo 5 - Composição bromatológica e digestibilidade de
genótipos de cana-de-açúcar colhidos em duas épocas
do ano**

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da época de corte sobre a composição bromatológica e digestibilidade *in vitro* de genótipos de cana-de-açúcar, e estabelecer possíveis correlações entre composição química e digestibilidade *in vitro* da planta inteira de genótipos da cana-de-açúcar. Nove genótipos foram colhidos em maio e setembro de 2006. Em maio, somente a fração planta inteira foi analisada, em setembro foram separados em colmos, folhas ou planta inteira para determinação da composição bromatológica, sacarose (POL) e digestibilidade *in vitro*. Colmos apresentaram menor teor de fibra em detergente neutro (FDN) e lignina (LIG), e maior digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) do que folhas. Em contrapartida, apresentaram menor digestibilidade *in vitro* da FDN (DIVFDN), maior razão LIG/FDN e menor concentração de proteína bruta (PB). Houve redução no teor e digestibilidade da FDN com o avanço da maturidade, enquanto que DIVMS, POL e lignina aumentaram. A DIVMS se mostrou negativamente correlacionada com FDN e FDN/POL, porém não houve correlação entre DIVFDN e FDN ou FDN/POL. Conclui-se que o avanço da maturidade promove redução na DIVFDN e aumento na DIVMS, não existindo correlação genética entre acúmulo de açúcar e digestibilidade *in vitro* da fibra.

Palavras-chave: Açúcar. Colmo. Fibra. Lignina. *Saccharum officinarum*.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of time of harvest on chemical composition and *in vitro* digestibility of sugarcane genotypes, and to determine possible correlations between chemical composition and *in vitro* digestibility of the whole plant in sugarcane genotypes. Nine genotypes were harvested in May and September of 2006. In May, only the whole-plant fraction was analyzed, in September the genotypes were separated in stems, leaves or whole-plant for determination of chemical composition, sucrose (POL) and *in vitro* digestibility. Stems had lower neutral detergent fiber (NDF) and lignin (LIG) and greater *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) than leaves. However, stems had lower *in vitro* NDF digestibility (IVNDFD), higher LIG/NDF ratio and lower crude protein (CP). The NDF and IVNDFD were reduced with advanced maturity, while IVDMD, POL and lignin were increased. IVDMD was negatively correlated with NDF and NDF/POL, however there was no correlation between IVFDND and NDF or NDF/POL. It can be concluded that with the advance in maturity the IVNDFD was reduced and IVDMD was increased, and there was no genetic correlation between accumulation of sugar and *in vitro* fiber digestibility.

Keywords: Fiber. Lignin. *Saccharum officinarum*. Stems. Sugar.

5.1 INTRODUÇÃO

Apesar do pior valor nutritivo em relação às silagens de milho e sorgo (ANDRADE et al., 2004), a cana-de-açúcar apresenta características de grande interesse aos bovinocultores como elevada produção de massa seca por hectare, facilidade de cultivo e persistência da cultura, boa aceitação pelos animais, elevado teor de carboidratos solúveis e menor custo de produção (FREITAS et al., 2006; LANDELL et al., 2002). Ao contrário de outras plantas forrageiras, a cana não reduz seu valor nutritivo de forma expressiva no período de estiagem, e destaca-se pelo aumento no teor de sacarose nesta época do ano (BORGES; PEREIRA, 2003).

A ocorrência de variações nos parâmetros de qualidade nutricional das plantas forrageiras segundo a espécie, variedade, estágio de maturação, parte da planta considerada (colmo ou folhas), fertilidade do solo, entre outros, já é bastante conhecida e possibilita o emprego do melhoramento genético como ferramenta para a manipulação da qualidade das forragens (CASLER, 2006). No entanto, o melhoramento da cana-de-açúcar tem se direcionado principalmente para os objetivos industriais de produção de açúcar e álcool combustível, os quais buscam apenas maiores teores de sacarose (AZEVEDO et al., 2003a). Porém, além do teor de sacarose, a qualidade da fibra é de fundamental importância, evidenciando a necessidade do estabelecimento de critérios de seleção visando especificamente à alimentação animal (FREITAS et al., 2006).

A principal limitação para o uso da cana-de-açúcar na nutrição de animais de elevado potencial de produção é a baixa digestibilidade da fibra, aliado ao baixo teor de proteína bruta (PEREIRA et al., 2001). Outro fator de importante efeito na qualidade nutricional da cana-de-açúcar é a idade da planta, uma vez que as diferentes variedades apresentam curvas de maturação distintas, com variações na porcentagem de sacarose dentro da curva (ANDRADE et al., 2004). Esse aumento da sacarose com a maturidade da planta influencia a relação FDN/POL, devido ao efeito de diluição do teor de FDN da cana, devendo este parâmetro ser considerado na utilização da cana para alimentação animal.

O objetivo foi avaliar o efeito da época de corte sobre a composição bromatológica e digestibilidade *in vitro* de genótipos de cana-de-açúcar, e estabelecer possíveis correlações entre composição química e digestibilidade *in vitro* da planta inteira de genótipos da cana-de-açúcar.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de avaliação de clones foi estabelecido no Centro de Cana-de-Açúcar, do Instituto Agronômico de Campinas, localizado em Ribeirão Preto-SP. Os genótipos estudados, provenientes do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agronômico de Campinas, foram obtidos por intermédio de hibridações realizadas em 2004 em Camamu (BA).

Os genótipos foram plantados na semana de 4 a 8 de julho de 2005 e irrigados até o final do período seco (setembro de 2005). As parcelas consistiam de duas linhas vizinhas de 4 metros de comprimento para cada genótipo. Foram realizadas seleções nos anos de 2005 e 2006 elegendo-se clones com características agronômicas como: elevado teor de açúcares, uniformidade de parâmetros biométricos de produção, hábito de crescimento ereto, capacidade de rebrotação no período de seca, resistência à ferrugem da folha (*Puccinia melanocephala*), dentre outras. Além dos dados de produtividade, estes materiais foram avaliados quanto ao teor de FDN, sacarose aparente (POL), celulose e lignina.

Com base nos resultados obtidos, sete clones e duas variedades comerciais foram selecionados para o presente estudo, visando a avaliação da digestibilidade *in vitro* da MS e da FDN das frações colmo, folha e planta inteira. Foram selecionados três clones com baixa relação FDN/POL (2004-2102, 2004-2035, 2004-2263), dois clones com relação FDN/POL intermediária (2004-2158 e 2004-2024), dois clones com teores altos de FDN (2004-2120 e 2004-2168) e duas variedades comerciais, incluídas no estudo, como parâmetros de controle (IAC86-2480 e IACSP93-3046).

Os clones e as variedades foram colhidos nos meses de maio e setembro de 2006. O corte foi feito rente ao solo, colhendo-se 15 plantas inteiras por parcela. Somente na colheita de setembro foram separadas as frações colmo e folha, portanto os efeitos de época de corte se referem somente à fração planta inteira. As frações foram separadas, trituradas e secas em estufa de ventilação forçada a $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 72h. Após moagem em moinho, com peneira de 1 mm, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro. Os teores de FDN e lignina foram determinados conforme Goering e Van Soest (1970). A concentração de POL foi determinada segundo Fernandes (2003).

Para determinação da digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e da FDN (DIVFDN), um grama de amostra foi incubado por 30 h a 39°C com solução tampão de Goering (40 mL) e líquido ruminal (10 mL), segundo protocolo de Goering e Van Soest (1970). Apenas a fase

fermentativa foi conduzida, sendo determinado o teor de FDN após 30 h de incubação. O líquido ruminal foi retirado de três bovinos fistulados no rúmen recebendo dieta à base de cana-de-açúcar mais concentrado (30% da MS).

Para comparação das frações colmo, folha e planta inteira, somente os dados da coleta de setembro foram utilizados. Os dados foram analisados considerando-se o delineamento inteiramente ao acaso com nove repetições (clones). A análise estatística foi realizada utilizando-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (SAS, 2000) segundo o modelo: $Y = \mu + \text{Tecido} + \text{Clone} + e$.

Para determinação do efeito da época de corte sobre a composição bromatológica da planta inteira, considerou-se o delineamento inteiramente ao acaso com nove repetições (clones). A análise estatística foi realizada utilizando-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (SAS, 2000) segundo o modelo: $Y = \mu + \text{Idade} + \text{Clone} + e$. O procedimento PDIFF (SAS, 2000) foi utilizado para comparação das médias das épocas de corte, e o efeito de genótipo foi testado pelo teste-F com duas repetições (épocas de corte). Utilizou-se nível de significância de 5% para todos os testes realizados. É importante salientar que não se objetivou a classificação dos genótipos, mas sim a determinação da existência de variabilidade genética para os parâmetros estudados.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando-se a fração colmo e a fração folha de sete clones e duas variedades de cana-de-açúcar quanto ao teor de FDN, PB, lignina (% MS), relação lignina/FDN (LIG/FDN), digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e digestibilidade *in vitro* da FDN (DIVFDN), observou-se diferença ($P < 0,05$) para todas as variáveis (Tabela 1). A fração colmo apresentou menor teor total de FDN, e maior DIVMS comparada à fração folha e igual à fração planta inteira. Estes resultados estão próximos aos encontrados por Banda e Valdez (1976), que obtiveram 70,5 % de DIVMS para colmo de variedades de cana-de-açúcar colhidas aos 16 meses; e com Rodrigues et al. (1997), que avaliando 11 variedades de cana-de-açúcar colhidas aos 15 meses pós-plantio, observaram teores de FDN variando de 40,5 a 48,9 % nos colmos e de 76,6 a 80,8 % nas folhas, além de maior DIVMS (75,5 %) para a fração colmo em relação à folha (51,4 %). Já a relação LIG/FDN foi significativamente maior nos colmos do que nas folhas e planta inteira (Tabela 1), indicando maior lignificação da fibra nos colmos e

determinando a menor DIVFDN destes, em média 50,4 % inferior à das folhas. No entanto, apesar do maior teor de LIG/FDN , a fração colmo apresentou maior DIVMS que a folha (Tabela 1), provavelmente devido ao maior teor de açúcares solúveis. Estes resultados sugerem que a DIVFDN do colmo seria mais limitante ao desempenho animal do que a DIVMS.

Tabela 1 - Composição química e digestibilidade *in vitro* de tecidos de nove genótipos de cana-de-açúcar, colhidos em setembro¹

Tecidos	FDN ²	PB ³	LIG ⁴	LIG/FDN ⁵	DIVMS ⁶	DIVFDN ⁷
	----- % MS -----					
Folha	68,7 ^A	4,4 ^A	6,5 ^A	9,4 ^C	47,7 ^B	23,9 ^A
Colmo	38,2 ^C	1,6 ^B	5,6 ^B	14,8 ^A	66,3 ^A	11,9 ^C
Planta inteira	41,6 ^B	1,8 ^B	5,3 ^B	12,7 ^B	64,9 ^A	15,8 ^B
E.P.M. ⁸	0,93	0,33	0,17	0,38	0,80	0,97

¹Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ²Fibra em detergente neutro. ³Proteína bruta. ⁴Lignina. ⁵Lignina/FDN.

⁶Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (30h). ⁷Digestibilidade *in vitro* da FDN (30h). ⁸Erro padrão da média.

Quando a planta inteira foi avaliada, os teores de FDN, DIVMS e DIVFDN ficaram mais próximos aos valores da fração colmos do que da fração folhas (Tabela 1), evidenciando a importância do valor nutritivo do colmo da cana-de-açúcar em programas de melhoramento visando à alimentação animal.

A fração folha apresentou teor maior de PB do que o colmo (Tabela 1), o que concorda com os resultados de Rodrigues et al. (1997) que observaram valores de PB variando de 0,72 a 1,35 %, e de 4,61 a 6,05 % para colmos e folhas, respectivamente.

Avaliando-se a existência de variabilidade genética, observou-se efeito significativo de genótipo para as variáveis FDN, LIG, FDN/POL, LIG/FDN e DIVMS (Tabela 2) da planta inteira. No entanto, não houve efeito de genótipo quanto ao teor de POL, PB e DIVFDN da planta inteira. Apesar de não significativa, a DIVFDN apresentou variação média de 14,5 a 23,8 %, a ausência de efeito de genótipo sobre a DIVFDN pode ser decorrente do baixo número de repetições (duas).

Tabela 2 - Média da composição química e digestibilidade *in vitro* da planta inteira de nove genótipos de cana-de-açúcar, colhidos em duas épocas do ano

Clones	FDN ¹	PB ²	LIG ³	POL ⁴	FDN/POL	LIG/FDN	DIVMS ⁵	DIVFDN ⁶
	----- % MS -----			% MO		----- %MS -----		
IACSP93-3046	50,6	2,1	5,9	16,3	3,2	11,6	61,2	23,8
IAC86-2480	41,9	2,4	4,1	15,6	2,8	9,9	67,6	22,4
2004-2102	41,1	1,9	4,4	17,4	2,6	10,8	68,0	22,0
2004-2168	70,4	3,3	7,8	14,5	5,3	11,4	45,4	21,1
2004-2263	44,7	1,9	5,1	16,3	3,4	11,6	64,0	19,1
2004-2035	43,5	2,2	5,3	15,7	2,8	12,1	64,1	17,4
2004-2158	53,8	2,4	6,3	16,9	2,2	11,9	55,2	15,7
2004-2120	43,5	2,0	5,4	16,7	2,6	12,6	63,3	15,2
2004-2024	48,5	2,0	6,2	14,9	3,3	12,9	58,6	14,5
E.P.M. ⁷	2,3	0,3	0,2	1,2	0,4	0,4	1,5	2,4
Efeito de genótipos ⁸	**	ns	**	ns	*	*	**	ns

¹Fibra em detergente neutro. ²Proteína bruta. ³Lignina. ⁴Porcentagem de sacarose aparente na cana. ⁵Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (30h). ⁶Digestibilidade *in vitro* da FDN (30h). ⁷Erro padrão da média. ⁸Teste-F para efeito principal de genótipos. * e ** Significativo a 5% e a 1% de probabilidade, respectivamente. ^{ns}Não significativo.

Gooding (1982) sugere a relação FDN/POL como importante variável na escolha de variedades de cana-de-açúcar para a alimentação de bovinos e Rodrigues et al. (1997) indicam valor máximo de 2,7 para esta relação. A baixa digestibilidade da fibra da cana-de-açúcar provoca acúmulo de material não-degradado no rúmen, limitando o consumo voluntário por um mecanismo físico de repleção ruminal (CASLER, 2002) e comprometendo, desta forma, o consumo de energia pelo animal. Portanto, deve-se escolher variedades que possuam menor relação FDN/POL a fim de aumentar a DIVMS e evitar o efeito da fibra em limitar o consumo. No entanto, este critério não leva em conta a variação existente na taxa de digestão da FDN de genótipos de cana-de-açúcar, sendo este um importante fator que afeta o desempenho animal (OBA; ALLEN, 1999).

A DIVMS apresentou alta correlação negativa com o teor de FDN em ambas as épocas de corte, de forma que quanto maior o teor de FDN, menor será a DIVMS. A DIVMS mostrou-se também negativamente correlacionada com o teor de LIG (Tabelas 3 e 4). A DIVMS mostrou-se negativamente correlacionada com FDN/POL somente para os genótipos colhidos em maio (Tabela 3), sendo que não houve correlação significativa quando da colheita de setembro (Tabela 4). Este resultado pode ser explicado devido a menor variação existente nos valores de FDN/POL entre os genótipos colhidos em setembro (CV = 10%) do que em maio (CV = 29%). Não houve correlação entre DIVMS e teor de POL (Tabelas 3 e 4).

A DIVFDN não apresentou correlação com o teor de FDN, de LIG, de sacarose (POL) ou com a relação FDN/POL (Tabelas 3 e 4), contudo apresentou correlação negativa com LIG/FDN em ambas as épocas de corte.

Tabela 3 - Coeficientes de correlação de *Pearson* entre composição química e digestibilidade *in vitro* da planta inteira de nove genótipos de cana-de-açúcar, colhidos em maio

Parâmetros	POL ¹	FDN ²	FDN/POL	PB ³	LIG ⁴	LIG/FDN	DIVMS ⁵	DIVFDN ⁶
Parameters	POL	NDF	NDF/POL	CP	LIG	LIG/NDF	IVDMD	IVNDFD
POL	1	-0,53 ^{ns}	-0,75*	-0,49 ^{ns}	-0,33 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,50 ^{ns}	-0,40 ^{ns}
FDN		1	0,96**	0,80*	0,92**	0,01 ^{ns}	-0,99**	0,41 ^{ns}
FDN/POL			1	0,79*	0,82*	-0,13 ^{ns}	-0,94**	0,44 ^{ns}
PB				1	0,64 ^{ns}	-0,24 ^{ns}	-0,75*	0,63 ^{ns}
LIG					1	0,41 ^{ns}	-0,96**	0,03 ^{ns}
LIG/FDN						1	-0,15 ^{ns}	-0,85**
DIVMS							1	-0,27 ^{ns}

¹Porcentagem de sacarose aparente na cana. ²Fibra em detergente neutro. ³Proteína bruta.

⁴Lignina. ⁵Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (30h); ⁶Digestibilidade *in vitro* da FDN (30h). * e ** Significativo a 5% e a 1% de probabilidade, respectivamente. ^{ns}Não significativo.

Estes resultados demonstram que a DIVFDN não está correlacionada com a quantidade de fibra (FDN), mas sim com sua qualidade (relação LIG/FDN), indicando a possibilidade de seleção de variedades de cana-de-açúcar para nutrição de ruminantes, que apresentem, ao mesmo tempo, maiores teores de açúcares solúveis (POL) e elevada DIVFDN.

Tabela 4 - Coeficientes de correlação de *Pearson* entre composição química e digestibilidade *in vitro* da planta inteira de sete clone e duas variedades de cana-de-açúcar, colhidos em setembro

Parâmetros	POL ¹	FDN ²	FDN/POL	PB ³	LIG ⁴	LIG/FDN	DIVMS ⁵	DIVFDN ⁶
Parameters	POL	NDF	NDF/POL	CP	LIG	LIG/NDF	IVDMD	IVNDFD
POL	1	0,29 ^{ns}	-0,60 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	0,01 ^{ns}	-0,34 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	0,26 ^{ns}
FDN		1	0,59 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,88**	0,48 ^{ns}	-0,87**	-0,27 ^{ns}
FDN/POL			1	0,17 ^{ns}	0,74*	0,66 ^{ns}	-0,63 ^{ns}	-0,36 ^{ns}
PB				1	-0,02 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,21 ^{ns}
LIG					1	0,84**	-0,95**	-0,62 ^{ns}
LIG/FDN						1	-0,76*	-0,82*
DIVMS							1	0,71*

¹Porcentagem de sacarose aparente na cana. ²Fibra em detergente neutro. ³Proteína bruta.

⁴Lignina. ⁵Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (30h); ⁶Digestibilidade *in vitro* da FDN (30h). * e ** Significativo a 5% e a 1% de probabilidade, respectivamente. ^{ns}Não significativo.

A época de corte influenciou todos os parâmetros avaliados, exceto o teor de lignina (Figura 1). Houve redução no teor de FDN, PB, FDN/POL e DIVFDN na segunda época de corte, enquanto os teores de POL, a relação LIG/FDN e a DIVMS aumentaram. Avaliando variedades de cana-de-açúcar aos 6 e aos 24 meses, Kung Jr e Stanley (1982) observaram redução no teor de FDN (68,30 para 52,60 %), enquanto a lignina aumentou de 6,3 % para 7,3 %, respectivamente. Azevêdo et al. (2003a) observaram aumento nos teores de FDN do primeiro para o segundo corte, sendo que o teor de FDN foi menor nos cortes subseqüentes. Já o teor de lignina na planta toda sofreu queda de 14,1%, no primeiro corte, para 13,0% nos cortes subseqüentes.

Segundo Brugnaro et al. (1998), a medida que diminui a atividade vegetativa da cana-de-açúcar, com o avanço do estágio de maturação, os teores de açúcar (BRIX e POL) crescem até um máximo e, depois, voltam a cair. Avaliando três variedades, Landell et al. (1999) observaram um crescimento no teor de POL da cana-soca até a colheita de final de agosto, sendo que houve uma pequena redução no teor de POL entre a colheita de agosto e de outubro. Esta redução não foi observada para as mesmas variedades no primeiro ano de colheita (cana-planta). Maule et al. (2001), ao avaliarem 9 cultivares colhidos em maio, agosto e outubro, observaram aumento no teor de POL para a colheita em outubro.

Figura 1 - Efeito da época de corte sobre a composição bromatológica e digestibilidade *in vitro* da planta inteira de cana-de-açúcar (média de nove clones). POL = Sacarose aparente (% MO da cana); FDN = Fibra em detergente neutro; PB = proteína bruta, LIG/FDN = lignina/FDN, DIVFDN = digestibilidade *in vitro* da matéria seca (30h); DIVFDN = digestibilidade *in vitro* da FDN (30h). * e ** Significativo a 5% e a 1% de probabilidade, respectivamente

Fernandes et al. (2003), avaliando a composição da cana em 3 idades de corte, observaram elevação linear do teor de brix. Esta importante característica explica os resultados obtidos neste trabalho, pois o aumento no teor de açúcar produz um efeito de diluição da FDN na matéria seca. Como não houve alteração no teor de lignina e houve redução da proporção de FDN, a relação LIG/FDN aumentou com o avançar da idade, levando à redução da DIVFDN. Já o aumento na DIVMS é explicado pelo acúmulo de sacarose, que é prontamente digestível. O efeito de diluição da FDN pelos crescentes teores de açúcares solúveis melhora o valor nutritivo da cana-de-açúcar como planta forrageira, uma vez que a fibra da cana apresenta como característica baixa digestibilidade e os açúcares são considerados prontamente digestíveis (LANDELL et al., 2002).

A redução observada nos teores de PB da primeira para a segunda época de corte está

de acordo com Andrade et al. (2004), que compararam 60 genótipos de cana-de-açúcar cortados aos 12 e aos 18 meses e observaram redução no teor de PB de 2,59 para 2,34 %, respectivamente. Durante a maturação, ocorre maior desenvolvimento dos colmos em relação ao número de folhas e, como a PB da cana-de-açúcar está concentrada principalmente em suas folhas, a maior relação colmo:folha irá causar redução relativa no teor de PB da planta.

É importante conhecer a qualidade da cana, em termos de fibra, conteúdo de açúcares e relação fibra/açúcar. Rodrigues et al. (1997) comentaram que variedades que apresentam menor teor de FDN, permitem ao animal maior consumo de energia, do que variedades com teor de açúcar um pouco melhor, porém com maior teor de FDN. A digestibilidade tem sido utilizada como variável de qualidade, indicando a proporção do alimento que está apta a ser utilizada pelo animal (VAN SOEST, 1994). No entanto, em um trabalho utilizando cana descascada, com maior DIVMS, Preston (1982) não observou melhoria no ganho de peso dos animais, demonstrando que a DIVMS não deve ser considerada isoladamente como parâmetro para escolha de variedades de cana-de-açúcar para a alimentação animal. A taxa de digestão ruminal da FDN da fração colmo é uma característica importante a determinar o valor nutritivo da cana-de-açúcar.

5.4 CONCLUSÃO

O avanço da maturidade promove aumento nos teores de sacarose e digestibilidade da matéria seca, e queda na digestibilidade da FDN e na relação FDN/POL da planta inteira de cana-de-açúcar. A fração colmo de cana-de-açúcar apresenta maior digestibilidade *in vitro* da MS e baixa digestibilidade da FDN, quando comparado com a fração folha. Como a DIVFDN não está correlacionada com teor de sacarose ou relação FDN/POL, não é esperado que a seleção de genótipos com maior DIVFDN do colmo altere o teor de açúcar do mesmo.

5.5 REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. B. de. et al. Composição química de genótipos de cana-de-açúcar em duas idades, para fins de nutrição animal. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 3, p. 341-349, 2004.
- AZEVEDO, J. A. G. et al. Avaliação da divergência nutricional de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1431-1442, 2003a.
- AZEVEDO, J. A. G. et al. Composição químico-bromatológica, fracionamento de carboidratos e cinética da degradação *in vitro* da fibra de três variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1443-1453, 2003b.
- BANDA, M.; VALDEZ, R. E. Effect of stage of maturity on nutritive value of sugar cane. **Tropical Animal Production**, v. 1, n. 1, p. 94-97, 1976.
- BORGES, A. L. C.C.; PEREIRA, L. G. R. Cana-de-açúcar como volumoso para bovinos. In: MARQUES, D. C. (Ed.). **Criação de bovinos**. 7.ed. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, 2003. p. 221-224.
- BRUGNARO, C. et al. Maximização da produção de uma usina de açúcar. **Brasil Açucareiro**, v. 106, n. 5/6, p. 2-8, 1988.
- CASLER, M. D. Breeding for increased forage quality. In: LAMKEY, K. R.; LEE, M. (Ed.). **Plant breeding: arnel hallauer international symposium**. Oxford, UK: Blackwell Publishers. 2006. p.323-334.
- CASLER, M. D. Divergent selection for two measures of intake potential in smooth brome grass. **Crop Science**, v. 42, n. 5, p. 1427-1433, 2002.
- FERNANDES, A. C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar**. 2. ed. Piracicaba: STAB, 2003. 240 p.
- FERNANDES, A. M. et al. Composição químico-bromatológica de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp* L.) com diferentes ciclos de produção (precoce e intermediário) em três idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 4, p. 977-985, 2003.
- FREITAS, A.W. de P. et al. Avaliação da divergência nutricional de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 229-236, 2006.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications**. Washington: USDA, 1970. 20 p. (Agriculture Handbook, 379).

GOODING, E. G. B. Effect of quality of cane on its value as livestock feed. **Tropical Animal Production**, v. 7, n. 1, p. 72-91, 1982.

KUNG JR., L.; STANLEY, R. W. Effects of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugarcane preserved as silage. **Journal of Animal Science**, v. 54, p. 689-696, 1982.

LANDELL, M. G. de A. et al. Avaliação final de clones IAC de cana-de-açúcar da série 1982, em latossolo roxo da região de Ribeirão Preto. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 269-280, 1999.

LANDELL, M.G. de A. et al. **A variedade IAC86-2480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros: manejo de produção e uso na alimentação animal**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2002. 39 p. (Série Tecnologia APTA, Boletim Técnico IAC; 193).

MAULE, R. F. et al. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 2, p. 295-301, 2001.

MELLO, S. Q. S. et al. Parâmetros do valor nutritivo de nove variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 373-380, 2006.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 3, p. 589-596, 1999.

PEREIRA, E. S. et al. Fontes nitrogenadas e uso de *Sacharomyces cerevisiae* em dietas à base de cana-de-açúcar para novilhos: consumo, digestibilidade, balanço nitrogenado e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 563-572, 2001.

PRESTON, T. R. Nutritional limitations associated with the feeding of tropical forages. **Journal of Animal Science**, v. 54, n. 4, p. 877-884, 1982.

RODRIGUES, A. A. et al. Efeito da qualidade de variedades de cana-de-açúcar sobre seu valor como alimento para bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1333-1338, 1997.

SAS. INSTITUTE. **SAS user's guide**. Version 8.0. Cary: SAS, 2000, 1042 p.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

Capítulo 6 - Prospecção de genes relacionados com a digestibilidade da parede celular de *Panicum maximum*

RESUMO

A lignificação da parede celular com o avanço da maturidade é o principal fator limitante da produtividade de ruminantes em sistemas tropicais, e pequenas alterações na digestibilidade da parede celular pode resultar em enormes benefícios econômicos para a indústria pecuária. Objetivou-se identificar os genes relacionando com rápido declínio da digestibilidade da parede celular com o avanço da maturidade, de modo a identificar alvos para manipulações genéticas futuras. Onze genótipos de *Panicum maximum* foram colhidos com 30, 60 e 90 dias de crescimento. Amostras foram separadas em três frações: lâminas foliares, colmos e material senescente. Após secagem e moagem, as frações foram incubadas por 30h a 39°C em fluido ruminal e solução de MacDougall para determinação da digestibilidade *in vitro* da FDN (DIVFDN). Dos 11 genótipos avaliados, selecionamos 3 com declínio lento na DIVFDN do colmo e 3 com rápido declínio da DIVFDN do colmo com o avanço da maturidade, para avaliação da expressão gênica. O RNA total foi isolado, tratado com DNaseI e convertido a cDNA para quantificação por PCR. PCR em tempo real foi utilizado para quantificar a expressão de genes da via de lignificação, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para fenilalanina amônio liase (PAL), ácido caféico O-metiltransferase (COMT), cinamato 4-hidroxilase (C4H), cianamil CoA redutase (CCR), cinamoil álcool desidrogenase (CAD) e 4-cumarato CoA ligase de *P. maximum*. A expressão de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizada como gene controle. A existência de interação grupo x maturidade indica que o gene de interesse foi expresso diferencialmente entre os grupos de rápida ou lenta queda de DIVFDN do colmo. Houve interação significativa para os genes C4H, COMT e PAL aonde houve maior aumento na expressão de 30 para 60 dias de crescimento no grupo com rápida queda da DIVFDN, e sem diferença com 90 dias de crescimento. Estes resultados indicam que a queda rápida da DIVFDN do colmo de *P. maximum* está relacionada com aumento na expressão destes genes.

Palavras-chave: Expressão gênica. Lignina. *Panicum maximum*. Parede celular.

ABSTRACT

Cell wall lignification with advanced maturity is the main limiting factor for ruminant production in tropical systems and even little changes in cell wall digestibility through genetic modification would result in large economical benefits for the cattle and dairy industry. Our objective was to identify the genes related to rapid decline in cell wall digestibility with advanced maturity, in order to identify targets for future genetic manipulations. Eleven genotypes of *Panicum maximum* were harvested at 30, 60 and 90 days of regrowth. Samples were divided in three fractions: leaf blades, stems and senescent material. After drying and grinding, the fractions were incubated for 30h at 39°C in ruminal fluid and MacDougall solution for determination of in vitro cell-wall digestibility (NDFD). There was no difference among genotypes for NDFD of leaves, but there was a significant genotype and genotype x maturity interaction for NDFD of stems. From the 11 genotypes, we selected 3 with the slowest decline in stem NDFD and 3 with rapid decline of stem NDFD with advanced maturity for gene expression evaluation. Total RNA was isolated, treated with DNaseI and converted to cDNA for PCR quantification. Real-time PCR was used to quantify the expression of genes from the lignin biosynthesis pathway, using oligonucleotide primers specific for *P. maximum* phenylalanine ammonia lyase (PAL), caffeic acid O-methyltransferase (COMT), cinnamate 4-hydroxylase (C4H), cinnamoyl-CoA reductase (CCR), cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) and 4-coumarate CoA ligase (4CL). Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a control gene. We were interested in existing treatment x maturity interaction, which would indicate that the referred gene was expressed differentially between the rapid and the slow group of genotypes. There was a significant interaction for the genes C4H, COMT and PAL where there was larger increase in expression from 30 to 60 days in the rapid group and no difference with 90 days of regrowth. These results indicate that the larger increase in expression of these genes from 30 to 60 days of regrowth could explain the faster decline in NDFD

Keywords: Cell wall. Gene expression. Lignin. *Panicum maximum*.

6.1 INTRODUÇÃO

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 et al., 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.

Devido aos enormes benefícios econômicos que podem ser atingidos, esforços consideráveis têm sido empregados nos países de clima temperado visando à 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 à 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 e na produção de etanol celulósico, porque a lignina precisa ser removida das fibras de madeira e reduz o potencial de sacarificação da celulose por enzimas celulasas (BAUCHER et al.,

2003).

Apesar de não ser conhecido como ocorre o controle da síntese de lignina, evidências experimentais sugerem que a deposição de lignina ocorre de maneira distinta em diferentes tecidos da planta e espécies vegetais (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996). 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 gramíneas 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).

Com isso, a proposta com este trabalho é estudar o padrão de expressão gênica das principais enzimas envolvidas com biossíntese de monolignóis: fenilalanina amônio liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H), 4-cumarato CoA ligase (4CL), cianamil CoA redutase (CCR), CAD e COMT, em *Panicum maximum* visando a identificação das enzimas mais fortemente correlacionadas com o acúmulo de lignina e queda da digestibilidade ruminal dos tecidos. O objetivo geral é o de fornecer conhecimento básico sobre o processo de lignificação em plantas forrageiras tropicais de modo a permitir o desenvolvimento da pesquisa visando à modificação da síntese de lignina e melhora na digestibilidade ruminal de forrageiras.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Tecido vegetal

As características e composição das amostras foram totalmente descritas no capítulo 3. Em resumo, parcelas estabelecidas de onze genótipos de *P. maximum* foram cultivadas na estação experimental da EMBRAPA Gado de Corte (Campo Grande, MS, 20°26'S, 54°43'W; 530,7 m acima do nível do mar). Após corte de nivelamento aproximadamente 20 cm acima do solo no dia 29 de dezembro de 2005, as parcelas foram fertilizadas com 100 kg/ha de N (uréia), 100 kg/ha de P₂O₅ (superfosfato simples) e 100 kg/ha de K₂O (cloreto de potássio) e colhidas após 30, 60 ou 90 dias de crescimento. Cada genótipo foi replicado em três parcelas com 6 linhas de 4m de comprimento espaçadas em 0,5 m, em um delineamento de blocos ao

acaso. A cada idade de colheita, duas linhas foram cortadas a aproximadamente 20 cm do solo com ceifadora motorizada. Uma subamostra de aproximadamente 2 kg foi coletada e separada em lâmina foliar, colmo (contendo bainha foliar) e material senescente; e armazenada a -20°C em sacos plásticos para análise da composição bromatológica e digestibilidade ruminal *in vitro* após 30h de incubação em fluido ruminal (GOERING; VANSOEST, 1970). Uma porção do colmo foi cortada com tesouras, acondicionadas em tubos Falcon de 15 ml, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C para análise subsequente.

Os onze genótipos foram classificados de acordo com a inclinação da curva de declíneo da digestibilidade da FDN do colmo com o avanço da maturidade (Tabela 1). Os três genótipos com queda rápida (grupo RÁPIDA) da digestibilidade da FDN do colmo (Milênio, Mombaça e Tanzânia) e os três genótipos com queda lenta (grupo LENTA) da digestibilidade da FDN do colmo (Massai, PM49, PM37) foram selecionados para estudo da expressão gênica das enzimas da via da lignificação.

Tabela 1 – Digestibilidade *in vitro* da FDN do colmo de 11 genótipos de *P. maximum* colhidos em três idades de corte

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

¹EPM: Erro padrão da média. ^{ABCD} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si pela análise de Tukey à 5%. ■ Grupo LENTA ■ Grupo RÁPIDA

Como observado na tabela 1, os acessos PM39, PM47 e a cultivar Massai apresentaram uma manutenção desejável da digestibilidade da FDN (DIVFDN), enquanto os cultivares Milênio, Tanzânia e Mombaça, apresentaram uma queda drástica da DIVFDN com o avanço da maturidade.

Extração do RNA total e síntese de cDNA 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 seis 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). 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 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.

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 *SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen®), usando 5 µg de RNA total das amostras de tecidos como molde da reação. 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.

Identificação e sequenciamento dos genes de interesse em P. maximum

Como as sequências dos genes de interesse em *P. maximum* não eram conhecidas, oligonucleotídeos iniciadores degenerados foram produzidos com base nas sequências do milho e do arroz (Tabela 2).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR comum

Gene	Oligonucleotídeos	Tamanho dos fragmentos amplificados
GAPDH	F: 5'-GTTCGTTGTTGGTGTCAACG-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'-TGGATTCGGTGAAGAA(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

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 3). 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 MgCl₂ (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 Image Gauge versão 3.12 (Fuji Film).

Tabela 3 - 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	

Após a amplificação por PCR, os insertos foram purificados utilizando-se o kit GFX PCR Purification (GE Healthcare), seguido de precipitação com etanol. O DNA resultante foi diluído em água e quantificado em espectrofotômetro.

O sequenciamento dos insertos foi realizado em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia Animal - ESALQ/USP. A reação de sequenciamento foi realizada segundo o protocolo do kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems). Os reagentes utilizados para a preparação do mix foram: 18 μL (3 μL por reação) de Tampão Save Money (200 mM de Tris pH 9, 0,5 mM MgCl_2), 12 μL (2 μL por reação) de *Kit Dyenamic Et terminator*, 18 μL (3 μL por reação) de $\text{H}_2\text{O}_{\text{MiliQ}}$, totalizando 48 μL . O mix foi mantido no gelo e o tubo agitado em Vórtex por alguns segundos ao final da confecção. Foram utilizados 8 μL de mix em cada reação. Para completar a reação de sequenciamento foi colocado mais 1 μL de DNA (60-70ng) de cada gene de interesse (GAPDH, 4CL, CAD, C4H, CCR, COMT ou PAL), sendo 2 pocinhos da placa por amostra e 1 μL de *primer* senso (5 pmoles/ μL), cada um com sua respectiva amostra, realizando ressuspensão do DNA e do primer. Ao final havia 10 μL de solução por reação. A placa foi coberta com um tapete de borracha, homogeneizada em Vórtex e levada ao termociclador.

A reação de sequenciamento compreendeu desnaturação inicial de 95°C por 20 segundos, seguida por anelamento a 55 °C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto, totalizando 25 ciclos.

Para a purificação da reação de seqüenciamento foram adicionados 2 μL de Acetato de Sódio/EDTA (1,5 M NaAc e 259 mM EDTA) por pocinho, misturando bem com a pipeta e agitando em Vórtex. Foram adicionados 60 μL de etanol absoluto (por pocinho) e novamente misturado em Vórtex. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 3.200 x g a 4 °C, o sobrenadante foi removido por inversão e sofreu um spin (centrifugação até atingir 800 rpm e pára a centrífuga) sobre um papel toalha dobrado, sendo após, adicionado de 150 μL de etanol 70% e centrifugado por 15 minutos a 3.200 x g a 4 °C. Novamente a placa foi submetida a um spin. A placa foi seca por 1 hora a temperatura ambiente, no escuro, e o *pellet* suspenso em 10 μL de Formamida. As amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95°C, resfriadas em gelo e aplicadas em seqüenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

As análises da qualidade e alinhamento das seqüências geradas foram feitas utilizando-se os programas Phred (EWING et al., 1998) e Cap3 (HUANG; MADAN, 1999). As seqüências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando-se dos programas *BLAST -Basic Local Alignment*

Search Tool- (ALTSCHUL et al., 1990) e classificadas de acordo com as seqüências do *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org>).

Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real

Após o sequenciamento parcial dos genes de interesse em *P. maximum*, novos oligonucleotídeos iniciadores específicos para *P. maximum* foram sintetizados para amplificação por PCR em tempo real (Tabela 4). Alguns primers permaneceram degenerados devido a dúvidas remanescentes nos cromatogramas de seqüenciamento.

Tabela 4 - 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

Os oligonucleotídeos foram diluídos em água, para obter a concentração final de 100 µM. 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, MgCl₂, 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 (TM) 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.

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 Ct (*threshold cycle* ou quantidade de ciclos necessários para amplificação do gene em questão) *versus* o Log₂ 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):

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.

Análise estatística

O procedimento MIXED (SAS, 2000) foi utilizado 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 grupo (RÁPIDA OU LENTA), gene, e a interação do grupo x gene. A hipótese nula foi aquela aonde $GeneAlvo_{RÁPIDA} - GAPDH_{RÁPIDA} = GeneAlvo_{LENTA} - GAPDH_{LENTA}$, ou alternativamente: $(GeneAlvo_{RÁPIDA} - GeneAlvo_{LENTA}) - (GAPDH_{RÁPIDA} - GAPDH_{LENTA}) = 0$. O contraste foi usado para contrastar o efeito do grupo 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 $P < 0,10$.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sequenciamento dos genes de interesse

As sequências completas obtidas dos genes GAPDH, CAD, CCR, C4H, 4CL, PAL e COMT se encontram nos anexos A e B. Busca-se indicar o grau de semelhança com as sequências de nucleotídeos de gramíneas já extensamente sequenciadas, como a cana-de-açúcar (RAMOS et al., 2001) e o milho (MARTIENSSEN et al., 2004). Um alto grau de

similaridade entre as plantas abre a possibilidade de se utilizar bancos de dados já existentes para estudos de expressão gênica em larga escala em forrageiras tropicais, como a construção de micro- ou macro-arranjos de DNA. Comparando as seqüências das enzimas GAPDH, PAL, CAD, COMT, C4H, 4CL e CCR do *P. maximum* e de outras três espécies de gramíneas, pôde-se observar a grande semelhança existente com a seqüência do milho (*Zea mays*), de arroz (*Oryza sativa*) e de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) (Tabela 5).

Tabela 5 - Similaridade da seqüência de nucleotídeos de fragmentos de DNA amplificados por PCR para *Panicum maximum* com outras seqüências de gramíneas depositadas no GeneBank

Gene	Arroz	Milho	Cana-de-açúcar
GAPDH	81%	84%	88%
PAL	91%	92%	87%
CAD	84%	90%	90%
COMT	90%	95%	-
C4H	93%	95%	-
4CL	89%	93%	-
CCR	90%	90%	90%
Média	88%	91%	89%

Quantificação da expressão gênica

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 1.

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 6). Cada gene foi amplificado 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 (2 genótipos x 2 genes x 3 idades x 2 repetições).

Figura 1 - Validação do ensaio de PCR quantitativo.

Tabela 6 - Ciclo de limiar de detecção do corante SYBR-Green (Ct)

Genótipo	Grupo	Idade	GAPDH	C4H	4CL	CAD	CCR	COMT	PAL
Massai	LENTA	30	21,0	24,4	26,7	26,9	24,7	26,1	30,2
Massai	LENTA	60	17,7	24,3	27,0	27,2	25,5	26,7	29,9
Massai I	LENTA	90	19,4	24,2	26,7	28,0	25,2	28,2	31,2
PM39	LENTA	30	21,3	27,3	26,1	26,2	23,1	26,3	33,2
PM39	LENTA	60	22,7	29,4	26,4	29,3	25,8	28,1	34,6
PM39	LENTA	90	22,1	26,5	24,5	27,9	23,9	26,0	34,2
PM47	LENTA	30	21,3	27,9	30,3	27,3	24,8	25,5	30,2
PM47	LENTA	60	24,9	29,1	33,5	30,6	27,3	29,7	31,3
PM47	LENTA	90	24,8	28,9	32,4	31,0	28,1	28,0	31,3
Milênio	RÁPIDA	30	22,7	32,5	27,9	28,9	28,2	36,4	33,8
Milênio	RÁPIDA	60	21,5	26,4	27,3	27,2	29,2	29,4	34,2
Milênio	RÁPIDA	90	19,5	27,0	28,6	27,4	27,9	28,9	32,6
Mombaça	RÁPIDA	30	22,0	29,0	25,2	30,1	25,5	29,0	31,1
Mombaça	RÁPIDA	60	22,6	27,1	25,3	29,9	26,9	27,1	30,0
Mombaça	RÁPIDA	90	22,1	28,3	25,2	28,2	25,9	29,2	31,1
Tanzânia	RÁPIDA	30	23,0	29,5	30,6	27,6	31,0	29,2	36,6
Tanzânia	RÁPIDA	60	21,9	27,1	29,3	26,8	31,0	28,6	32,5
Tanzânia	RÁPIDA	90	22,3	28,7	30,4	28,2	28,3	28,8	36,6

A existência de interação Grupo x Idade indica que a expressão do gene de interesse foi alterada diferencialmente pela maturidade entre os grupos de RÁPIDA e LENTA queda da DIVFDN do colmo. Houve interação significativa Grupo x Idade ($P < 0,05$) somente para os genes C4H e COMT (Tabela 7). A decomposição da interação pelo procedimento SLICE indicou a existência de efeito diferencial da maturidade entre os grupos para os genes 4CL e CCR, e tendência de efeito para o gene PAL (Tabela 7).

Tabela 7 - Probabilidade dos efeitos principais e interações sobre a expressão de genes de biossíntese da lignina e, dois grupos de *P. maximum* separados de acordo com a velocidade de queda da DIVFDN com o avanço da maturidade

Efeitos	Trt	C4H	4CL	CAD	CCR	COMT	PAL
Trt	-	0,08	0,87	0,41	0,03	0,27	0,51
Idade	-	0,002	0,004	0,75	0,02	0,68	0,20
Trt x Idade	-	0,024	0,34	0,65	0,75	0,006	0,13
Slice (Trt x Idade) ¹							
Trt x Idade	LENTA	0,004	0,002	0,484	0,285	0,167	0,261
Trt x Idade	RÁPIDA	0,012	0,276	0,881	0,046	0,016	0,086

¹Decomposição da interação Trt x Idade através da opção SLICE do SAS, ou seja, efeito de Trt dentro de cada grupo (LENTA ou RÁPIDA).

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 2). A expressão de C4H foi maior no grupo LENTA do que RÁPIDA com 90 dias de crescimento.

Figura 2 - Quantificação da expressão do gene cinamato 4-hidroxilase (C4H) em três idades de corte em dois grupos de genótipos de *P. maximum* separados quanto à intensidade de declínio da digestibilidade da FDN do colmo (queda rápida ou lenta)

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 3). 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 3 - Quantificação da expressão do gene 4-cumarato CoA ligase (4CL) em três idades de corte em dois grupos de genótipos de *P. maximum* separados quanto à intensidade de declínio da digestibilidade da FDN do colmo (queda rápida ou lenta)

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 4).

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 4).

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 5). 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 5).

Figura 4 - Quantificação da expressão do gene cianamyl CoA redutase (CCR) em três idades de corte em dois grupos de genótipos de *P. maximum* separados quanto à intensidade de declínio da digestibilidade da FDN do colmo (queda rápida ou lenta)

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 6), sendo que com 90 dias não houve diferença entre os grupos.

Não houve nenhum efeito significativo sobre a expressão do gene CAD entre os dois grupos estudados (Figura 7).

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.

Figura 5 - Quantificação da expressão do gene ácido caféico O-metiltransferase (COMT) em três idades de corte em dois grupos de genótipos de *P. maximum* separados quanto à intensidade de declínio da digestibilidade da FDN do colmo (queda rápida ou lenta)

Figura 6 - Quantificação da expressão do gene fenilalanina amônio liase (PAL) em três idades de corte em dois grupos de genótipos de *P. maximum* separados quanto à intensidade de declínio da digestibilidade da FDN do colmo (queda rápida ou lenta)

Figura 7 - Quantificação da expressão do gene cinamoil álcool desidrogenase (CAD) em três idades de corte em dois grupos de genótipos de *P. maximum* separados quanto à intensidade de declínio da digestibilidade da FDN do colmo (queda rápida ou lenta)

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 et al., 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).

6.4 CONCLUSÕES

As seqüências obtidas de nucleotídeos de *P. maximum* apresentam alta similaridade com outras gramíneas, principalmente com milho e arroz. Tal fato possibilita o uso de técnicas de hibridização de DNA entre *P. maximum*, cana-de-açúcar, milho e arroz.

O maior aumento na expressão dos genes COMT, PAL e C4H de 30 para 60 dias de crescimento pode explicar a queda mais acentuada na digestibilidade da FDN do colmo, colocando-os como possíveis alvos de projetos de engenharia genética visando o aumento da digestibilidade da planta.

6.5 REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ATANASSOVA, R.; FAVET, N.; MARTZ, F. et al. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing *O*-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. **The Plant Journal**, v. 8, p. 465-477, 1995.
- BAUCHER, M. et al. Lignin: genetic engineering and impact on pulp. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 305-350, 2003.
- BAUCHER, M.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M. et al. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 125-197, 1998.
- 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.; TOWERS, 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.
- 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.
- CHABANNES, M.; BARAKATE, A.; LAPIERRE, C. et al. 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. et al. 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. et al. 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 acidguanidinium

thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analitical Biochemistry**, London, v.162, n.1, p. 156-159, 1987.

DIXON, R. A.; CHEN, F.; GUO, D. J. et al. 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. et al. 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.

EWING B.; HILLIER L.; WENDL M.C.; GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v. 8, p.175-185, 1998.

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. Washington, DC, USA.: Agricultural Handbook, 1970. 379 p.

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

GUO, D. J.; CHEN, F.; INOUE, K. et al. 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.

HU, W. J.; KAWAOKA, A.; TSAI, C. J. et al. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 5407-12, 1998.

HUANG, X.; MADAN, A; CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, p. 868-877, 1999.

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. et al. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid *O*-methyltransferase activity. **Plant Physiology**. v. 123, p. 1363-1373, 2000.

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. et al. 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.
- MARTIENSSEN, R. A.; RABINOWICZ, P. D.; O'SHAUGHNESSY, A.; MCCOMBIE, W. R. Sequencing the maize genome, **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 7, p. 102-107, 2004.
- MECHIN, V.; ARGILLIER, O.; MENANTEAU, V. et al. Relationship of cell wall composition to *in vitro* cell wall digestibility of maize inbred line stems. **Journal Science Food and Agriculture**, v. 80, p. 574-580, 2000.
- 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.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucl. Acids Res**, v. 29, p. e45, 2001.
- 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.
- RAMOS, R. L. B.; TOVAR, F. J.; JUNQUEIRA, R. M. et al. Sugarcane expressed sequences tags (Ests) encoding enzymes involved in lignin biosynthesis pathways. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 235-241, 2001.
- SAS. Institute Inc. **Statistical Analysis System**: user's guide. Version 8.2. Cary: SAS Institute, USA, 2000.
- TSAI, C. J.; POPKO, J. L.; MIELKE, M. R. et al. 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. et al. 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**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- 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.
- YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F. et al. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 85, p. 1-12, 2006.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados de pesquisa apresentados, pode-se enumerar as seguintes considerações finais:

- 1) A maturidade teve grande efeito sobre a qualidade nutricional das três gramíneas estudadas, principalmente quanto à digestibilidade do FDN.
- 2) Existe grande variação entre os genótipos em relação ao efeito da maturidade sobre a digestibilidade da fração colmo, porém não há grande variabilidade quanto à digestibilidade da fração folha.
- 3) A maturidade tem maior efeito sobre a qualidade nutricional da fração colmo do que sobre a fração folha em *P. maximum*.
- 4) A digestibilidade da FDN da fração colmo de *P. maximum* foi maior do que a da fração folha quando os genótipos foram colhidos com 30 ou 60 dias, porém menor quando colhidos com 90 dias.
- 5) O acúmulo de açúcares no colmo de milho e cana-de-açúcar com o avanço da maturidade promove queda nos teores da FDN e aumento nos teores de lignina do colmo.
- 6) Ocorre redução na DIVFDN do 4º internódio com o avanço da maturidade, enquanto que não há efeito sobre a DIVFDN do 5º internódio, indicando que o 4º internódio do colmo pode ser utilizado como indicador da queda de digestibilidade da fibra do colmo de híbridos de milho que ocorre com o avanço da maturidade.
- 7) A fração colmo de cana-de-açúcar apresenta maior digestibilidade *in vitro* da MS e baixa digestibilidade da FDN, quando comparado com a fração folha.
- 8) Como a DIVFDN não está correlacionada com teor de sacarose ou relação FDN/POL em cana-de-açúcar, não é esperado que a seleção de genótipos com maior DIVFDN do colmo altere o teor de açúcar do mesmo.
- 9) As seqüências obtidas de nucleotídeos de *P. maximum* apresentam alta similaridade com outras gramíneas, principalmente com milho e arroz. Tal fato possibilita o uso de técnicas de hibridização de DNA entre *P. maximum*, cana-de-açúcar, milho e arroz.
- 10) O maior aumento na expressão dos genes COMT, PAL e C4H de 30 para 60 dias de crescimento pode explicar a queda mais acentuada na digestibilidade da FDN do colmo

de *P. maximum*, colocando-os como possíveis alvos de projetos de engenharia genética visando o aumento da digestibilidade da planta.

Com base nestas considerações, pode-se esperar maior chance de sucesso em programas de melhoramento genético que visem o aumento da digestibilidade do colmo do que da folha em gramíneas tropicais. Ainda, a digestibilidade da fibra do colmo não está fortemente correlacionada com o acúmulo de amido em milho ou de sacarose em cana, permitindo a seleção conjunta de parâmetros de qualidade nutricional e de produtividade industrial.

A inibição da expressão dos genes COMT, C4H e PAL em *P. maximum* através de engenharia genética pode levar a melhor manutenção da qualidade nutricional desta espécie ao longo do desenvolvimento, permitindo cortes com idades mais avançadas e com maiores produtividades de massa por área.

अनुसंधान

ANEXO A – SEQUÊNCIAS DE DNA DEPOSITADAS NO GENE BANK

As seguintes sequências 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 tacgggaagg cggtaggcgga gcaggcggcg tgggacgctg ctcgacaacg
61  cggcgtggac cttgttggtg tgaaccctgt gctggtggtg ggcccgtgct 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 ttcattcccc tcttcgcgcc attcctccgt
61  gggtagctca acagatgcca cgacctcaag acccgccgca tgaaggctct cgaggacaac
121 ttctgtccagg agcgcaagaa ggtgatggcc cagactggcg agatccggtg cgccatggac
181 cacatcctcg aggccgagag gaagggcgag 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 ggggttcagg tgccgcctgc agagcttgag
121 gccctcctca tcacgcaccc ggagatcaag gacgccgccc tcgtatcaat gaaggatgat
181 cttgccggtg aaatcccggc cgccttcctc gtgcggacag aagggctctga 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 aaccgcgtca ttgacgtctc ccgtggcaag gcgctccacg
61  gtggcaactt ccagggcacc cccatcggtg tctccatgga caacacccgc ctgcgccctg
121 ccgccatcgg caagctcatg ttgcgcgagt tctccgagct ggtgaacgac ttctacaaca
181 atggcctgcc ctccaaccta tctggtggac gcaaccccag cttggactac gggttcaagg
241 gtgctgagat cgccatggca tctactgctc ctgagctcca gttcctcggc aaccagtgta
301 ccaaccacgt gcagagcgct gacgagcaca 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

ANEXO B – SEQUÊNCIAS DE DNA NÃO DEPOSITADAS NO GENE BANK

Urochloa maxima glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA

1 GTTCGTTGTT GGTGTCAAC CGAGGGCAAG TACACCCCGG ATATTAACAT TGTCTCCAATG
61 CTAGNTGCAC CACAAATTG CCTTGCTCCC CTCGCCAAGA TCATCAATGA CAACTTCGGTA
121 CTTGTTGAGG GTCTGATGA CGACTGTTNA TGCCATTACT GCCACCCAGA AGACTGTTGAT
181 GGGCCCTCAG CANANGGAC GGGAGAGGTG GNCAGGGCTG CANCNCCTGG GCATCATTCCC
241 AGCAGCACTG GA

Urochloa maxima cinnamoyl-CoA reductase (CAD) mRNA

1 ACNGGGTNAC ACGNTTACTN GTGATCAGCT CGTCGTCCCG GAAGCGCGCG GAGAGCCATG
61 GTACCACCTG GGC GCGGACG CGTACCTGGA TGAGCTCGGA CGCCGAGGCC ATGGCGGCGG
121 CGGCCGACTC CCTCGTACTA CATCATCGAC ACGGTGCCCG CGCACCACCC AATGGAACCT
181 TACCTGGCGC TGCTGAAGCT GGACGGCAAG A