



MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO REGIONAL
SUPERINTENDÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DO NORDESTE

PLANO DE TRABALHO

1. DADOS CADASTRAIS DA UNIDADE DESCENTRALIZADORA

a) Unidade Descentralizadora e Responsável

Nome do órgão ou entidade descentralizador(a):	Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste – SUDENE
Nome da autoridade competente:	Evaldo Cavalcanti da Cruz Neto
Número do CPF:	053.451.424-32
Nome da Secretaria/Departamento/Unidade Responsável pelo acompanhamento da execução do objeto do TED:	Coordenação Geral de Estudos e Pesquisas – CGEP

b) UG SIAFI

Número e Nome da Unidade Gestora - UG que descentralizará o crédito:	533014/53203 - Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste – SUDENE
Número e Nome da Unidade Gestora responsável pelo acompanhamento da execução do objeto do TED:	33014/53203 - Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste – SUDENE (Coordenação Geral de Estudos e Pesquisas - CGEP)

2. DADOS CADASTRAIS DA UNIDADE DESCENTRALIZADA

a) Unidade Descentralizada e Responsável

Nome do órgão ou entidade descentralizada:	Instituto Nacional do Semiárido – INSA
Nome da autoridade competente:	Mônica Tejo Cavalcanti
Número do CPF:	036.091.014-90
Nome da Secretaria/Departamento/Unidade Responsável pela execução do objeto do TED:	Núcleo de Produção Vegetal

b) UG SIAFI

Número e Nome da Unidade Gestora - UG que receberá o crédito:	240114 - Instituto Nacional do Semiárido – INSA
Número e Nome da Unidade Gestora responsável pela execução do objeto do TED:	240114 - Instituto Nacional do Semiárido – INSA (Núcleo de Produção Vegetal)

3. OBJETO

Desenvolver pesquisas e desenvolvimento tecnológico com a palma forrageira visando o fortalecimento da atividade pecuária da região Semiárida, por meio da garantia da segurança forrageira, sustentabilidade ambiental e desenvolvimento econômico da região, através de ações de melhoramento genético e controle de pragas e doenças.

4. DESCRIÇÃO DAS AÇÕES E METAS A SEREM DESENVOLVIDAS NO ÂMBITO DO TED

4.1. Metodologia

O presente projeto terá dois enfoques principais, um no âmbito do desenvolvimento de pesquisas participativas e o outro no desenvolvimento de tecnologias visando o fortalecimento da atividade pecuária da região Semiárida.

Subprojeto 1: caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético de opuntiaspp visando a sua utilização como forrageira e prospectando novas potencialidades a partir da coleção do INSA

Ação 1. Caracterização morfoagronômicas e bromatológica de acessos de palma forrageira (Opuntias spp.)

Caracterização biométrica

Antes do plantio será feita uma padronização dos cladódios semente de cada genótipo visando obterem-se plantas as mais homogêneas possíveis. As avaliações de altura das plantas, número de cladódios por planta, comprimento, largura, diâmetro e perímetro dos cladódios de cada material serão

realizadas a cada três meses nos cladódios primários, secundários, terciários e quaternários até cada período da colheita (12 meses).

Para a aferição do diâmetro dos cladódios será utilizado um paquímetro digital modelo Digimess[®], enquanto que as demais variáveis serão mensuradas por meio de fita métrica. Para medição de altura da planta será considerado o comprimento desde o solo até a extremidade do artigo mais alto. A largura e o comprimento serão mensurados considerando a região de maior largura e comprimento dos cladódios, o número, diâmetro e perímetro serão aferidos em cladódios maduros, sendo desconsiderados brotos para evitar erros na coleta dos dados.

A área de cada cladódio (AC) será determinada conforme metodologia descrita por García de Cortázar e Nobel (1991), através da seguinte expressão: $AC = \text{Comprimento} \times \text{Largura} \times 0,632$ (fator de correção em função de forma de elipse do cladódio). A área fotossintética total da planta será obtida pela multiplicação da AC pelo número de cladódios. Posteriormente será determinado o índice de área de cladódio (IAC), dividindo a área do cladódio pela área ocupada por cada planta.

Caracterização fisiológica

As determinações das trocas gasosas serão realizadas das 00:00 às 2:00 da manhã através das variáveis condutância estomática (gs), transpiração (E), fotossíntese líquida (A) e concentração interna de carbono (Ci) utilizando um analisador de gás carbônico a infravermelho portátil (IRGA), modelo LI-COR 6400-XT, Lincon, USA, com luminosidade ajustada ambiente. De posse dos dados, será calculada a eficiência no uso da água (EUA), relacionando à fotossíntese líquida com a transpiração (A/E), eficiência intrínseca do uso da água, relacionando-se a fotossíntese pela condutância estomática (A/gs) e a eficiência instantânea de carboxilação ECi, relacionando a fotossíntese líquida (A) com a concentração interna de carbono (Ci).

Caracterização nutricional

Antes da colheita serão coletadas amostras de tecido do cladódio de cada material para determinação do teor de macro e micronutrientes. Será tomada uma amostra (cladódio) de cada planta, caracterizando-se por sustentar de um a dois cladódios jovens, a qual será picada e acondicionada em bandejas de papel alumínio, serão coletadas 10 amostras simples em cada subparcela para compor cada amostra composta.

Após a coleta, as amostras serão colocadas para secar em estufa de circulação de ar a 65°C até peso constante. Após a secagem, as mesmas serão moídas em moinho tipo Willey com peneira com crivos de 1 mm, identificadas e acondicionada em potes plásticos e posteriormente para realização das análises.

Nas amostras de cladódios da palma forrageira serão determinadas as concentrações de: Nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), expresso em g kg^{-1} ; boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), sódio (Na) e zinco (Zn), expressos em mg kg^{-1} . As determinações analíticas serão procedidas de acordo com Malavolta et al. (1989); Silva, (1999): N, digestão sulfúrica com o método Kjeldahl; P, K, S, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, e Na por digestão nítrico-perclórica e B por digestão via seca.

Caracterização produtiva

Para determinação da produção em massa verde (PMV) será realizada a colheita da biomassa aos doze meses após o plantio, preservando-se apenas a planta mãe. Os cladódios seccionados serão pesados para obtenção do peso total de cada planta, será considerado o peso médio das plantas de toda a parcela, multiplicando-se esse valor pelo número de plantas do estande em um hectare será obtido a PMV por hectare (t ha^{-1}). O teor de matéria seca (MS) será determinado por meio de secagem em estufa a 65°C até peso constante, sendo a produtividade de matéria seca (PMS) determinada pelo produto da multiplicação entre PMV e os teores de MS.

O acúmulo de água nas plantas será calculado subtraindo-se a PMV pela PMS e a eficiência no uso da água (EUA) estimada pelo produto da divisão entre a PMS pela quantidade acumulada de chuva adicionada da lâmina de irrigação aplicada durante cada ciclo produtivo. A extração/exportação de nutrientes pela palma forrageira será calculada em função da produção de matéria seca (PMS) e o teor de mineral no cladódio. A mesma sendo expressa em kg ha^{-1} para os macro e micronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, B, Zn, Fe, Mn e Na) (DONATO, 2011).

Caracterização Bromatológica

As análises serão realizadas no Laboratório de Bromatologia do INSA, serão determinados de acordo com as metodologias descritas por Silva & Queiroz (2009): matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína (FDNCP), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose, celulose, lignina, cinza, extrato etéreo (EE), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) e nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN).

As amostras coletadas no final do ciclo produtivo, com aproximadamente 250 gramas serão acondicionadas em bandejas de papel alumínio com as devidas identificações dos tratamentos e em seguida congeladas a 15°C, no dia seguinte as amostras serão descongeladas para a realização das análises. As alíquotas serão pré-secas em estufa de circulação de ar (65 °C) por 72 horas e moídas em um moinho tipo Willey com peneiras de malha de um milímetro.

Para determinação da fração de fibra em detergente neutro (FDN) será utilizada metodologia recomendada pelo fabricante do aparelho ANKON[®], da Ankon technology Corporation, sendo uma amostra de 0,5 g acondicionada em sacos de TNT (tecido-não-tecido de 100g/m²) previamente secos e pesados e submetidos à fervura com solução de detergente neutro ou detergente ácido por uma hora (Van Soest & Robertson, 1985), lavados com água quente e acetona, secos e pesados, de modo que o resíduo seja considerado FDN.

Para a estimativa dos carboidratos totais (CHOT) e dos carboidratos-não-fibrosos (CNF) serão utilizadas as seguintes equações propostas por Sniffen et al. (1992) e Hall et al., (1999), respectivamente: $CHOT = 100 - (\%PB + \%EE + \%Cinzas)$; $CNF = 100\% - (\%PB + \%FDN + \%EE)$.

Ação 2. Avaliação da diversidade genética entre e dentro de espécies de Opuntia com base em marcadores moleculares e seleção de potenciais genitores

Para um estudo de variabilidade intra e interespecífica em Opuntia, materiais de diferentes tecidos vegetais das espécies da coleção serão acondicionados separadamente em freezer a -20 °C, triturados em almofariz com nitrogênio líquido e armazenados para posterior extração dos DNA. Para tal, poderão ser utilizados o método Doyle & Doyle (1987) e/ou o DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). A quantificação da concentração de DNA de cada amostra será realizada por análise comparativa em gel de agarose 0,8 % (p/v).

Para determinação do polimorfismo serão utilizados primers ISSR e de DNA plastidial. As condições ideais de amplificação de cada primer ISSR serão otimizadas em testes preliminares, variando-se suas temperaturas de anelamento e as concentrações de Taq, de DNA, dos primers e do MgCl₂.

As reações de ISSR serão conduzidas em termociclador Mastercycler[®] Nexus gradiente 96 Well (Eppendorff), sob os seguintes passos: a) 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial; b) 35 ciclos de: 94 °C por 1 minuto; temperatura de anelamento (48 a 60 °C) por 45 segundos, e; 72 °C por 2 minutos; c) uma extensão final a 72 °C por 7 minutos e resfriado a 4 °C.

Os produtos da amplificação serão separados por eletroforese em gel de agarose 2,0 %, corados com intercalante de DNA fluorescente GelRed® – Biotium (Uniscience), em tampão 1X TBE, a 100 volts, por aproximadamente duas horas. Será usado o marcador molecular de 100 pares de bases (100bp DNA Ladder Sinapse Biotecnologia) para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. Os géis serão fotografados sob luz ultravioleta, utilizando o fotodocumentador L-PIX HE (Loccus Biotecnologia).

A partir dos géis fotodocumentados, serão analisados os produtos amplificados por cada indicador ISSR em cada amostra, para elaboração de uma matriz binária considerando presença (1) e ausência (0) para os fragmentos amplificados. Os programas FreeTree v.0.9.1.50 e TreeView v.1.6.6 serão utilizados para a construção dos dendrogramas. A matriz de similaridade genética será calculada utilizando o índice de similaridade de Jaccard. O dendrograma construído usando-se o algoritmo UPGMA considerando-se a matriz de similaridade.

Para as regiões de DNA plastídial, as reações de amplificação ocorrerão em 25 µL, com as seguintes proporções: 0,5-1 µL de DNA da amostra, 9,4 µL de H₂O, 5 µL de 5× tampão, 2,5 µL de 25 mmol/L MgCl₂, 1 µL de 2,5 mmol/L dNTPs, 2 µL betaína, 2 µL cada iniciador de 5 µmol/L e 0,1 µL de polimerase. As condições de ciclagem por PCR para os espaçadores intergênicos do plastídeo e matK seguiram Shaw et al. (2007), embora a temperatura inicial do anelamento será modificada para 55 °C e o número de ciclos também será aumentado para 35. As condições de ciclo de PCR para ITS serão uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos; seguido por 5 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos; seguido de 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 48 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos; com uma etapa final de extensão a 72 °C por 12 min. As condições de ciclagem de PCR para ppc foram de 95 °C por 5 min; seguido por 44 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, aumentando 0,3 °C / ciclo e 72 °C por 2,5 min; com uma extensão final de 72 °C por 10 min. As condições de ciclagem de PCR para ycf1 seguirá Neubig et al. (2008), com modificação da temperatura inicial de anelamento de 63 °C. O plastídeo ycf1 e o ppc nuclear serão seqüenciados apenas para os taxa diplóides de Opuntia. Todos os produtos de PCR serão inicialmente seqüenciados diretamente, exceto os híbridos presumidos e os táxons poliplóides.

As seqüências serão editadas no programa Sequencher 4.2.2 (Gene Codes, Ann Arbor, Michigan, EUA) ou Geneious Pro 5.1 (Biomatters Ltd., Auckland, Nova Zelândia) e alinhadas automaticamente usando o programa Muscle (Edgar, 2004); esse alinhamento foi então ajustado manualmente no programa Se-Al v2.0 (Rambaut, 2007). Todas as lacunas introduzidas durante o alinhamento serão codificadas como dados ausentes.

Acessos divergentes e que contenham as características de interesse ao programa de melhoramento genético serão selecionados como possíveis progenitores em futuros cruzamentos controlados.

Ação 3. Determinação do nível de ploidia dos acessos do banco de germoplasma por meio de citometria de fluxo e/ou contagem do número de cromossomos

Citometria de fluxo

Para a análise por citometria de fluxo, serão utilizados aproximadamente 800 mg de tecido de cacto jovem para a preparação da amostra. Suspensões de núcleos e tampões de isolamento nuclear serão preparados de acordo com Dolezel et al. (1989). No entanto, será modificado o tampão de isolamento nuclear adicionando 2-mercaptoetanol 15 mM recém-preparado e a última lavagem da amostra será realizada sem Triton para facilitar a citometria de fluxo.

As amostras serão incubadas em gelo durante a noite e os núcleos serão filtrados através de um filtro de nylon de 30 µm para remover fragmentos de células e detritos grandes. A suspensão dos núcleos será corada com 2 mg.ml⁻¹ de iodeto de propídio (PI) (Fluka, Buchs, Suíça). As amostras serão analisadas em um citômetro de fluxo Coulter EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL, EUA) equipado com um laser de íons de argônio resfriado a ar ajustado a 15 mW e operando a 488 nm. A fluorescência será coletada através de um filtro dicróico de passagem longa de 645 nm e um filtro de passagem de banda de 620 nm.

Os resultados serão adquiridos no software SYSTEM II versão 3.0 (Coulter Electronics). Antes da análise, o instrumento será calibrado quanto à linearidade com esferas fluorescentes (Coulter Electronics) e as configurações de amplificação serão mantidas constantes ao longo do experimento. O ganho do citômetro será ajustado para que o pico G1 de *Pisum sativum* com 9,09 pg de conteúdo de DNA nuclear (Dolezel et al. 1998) seja posicionado no canal 200. O nível de ploidia das plântulas regeneradas será determinado com base na comparação das posições de pico de *Opuntia ficus-indica*, plantas doadoras usadas como padrões de referência.

Contagem cromossômica

Para a caracterização cromossômica, cladódios de todos os genótipos de palma do BAG do INSA serão coletados e plantados em vasos com substrato contendo terra vegetal, e deixados em casa de vegetação até o início de emissão das raízes. Quando as plantas apresentarem entre 2,0 cm a 2,5 cm de raiz, será feita a coleta para a realização das análises citogenéticas.

As análises serão realizadas no Laboratório do INSA. As células da raiz serão tratadas com 8-hidroxiquinoleína 0,003 M mais DMSO (dimetilsulfóxido) à 36 °C. Em seguida serão fixadas em solução Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético glacial) e serão mantidas em geladeira por 24 horas. Posteriormente, serão hidrolizadas em HCL 1N à 60 °C, por 13 minutos e os tecidos meristemáticos serão macerados sobre lâminas com ácido acético 45%. Após secagem, as lâminas serão coradas com Giensa 2% por 4 minutos.

A observação do material será realizada em microscópio com aumento de 1000x. Para a contagem dos cromossomos serão realizadas 10 metáfases, fase propícia para a análise cromossômica e esse procedimento será realizado pelo sistema IKAROS (Metasystems). A biometria será realizada com o programa KS-300. Os comprimentos cromossômicos médios e seus respectivos desvios-padrão serão obtidos com a utilização do programa Excel.

Ação 4. Caracterização bioquímica dos perfis enzimáticos e compostos de interesse econômico em cladódios, frutas e sementes de palma forrageira, visando sua utilização na indústria

A caracterização bioquímica será realizada nos acessos de palma promissores quanto a resistência a Cochonilha-do-carmim e a Cochonilha-de-escama através da determinação da peroxidação lipídica e de enzimas antioxidantes, assim como compostos não enzimáticos.

Peroxidação lipídica

A caracterização do estresse oxidativo nas plantas será realizada em raquetes através da quantificação do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como produto final do processo de peroxidação de lipídios, com leituras a 535 e 600 nm. O teor de MDA será calculado conforme a equação específica para a reação (Shimizu et al., 2006).

Concentração de peróxido de hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas amostras de planta, será determinada em um meio de reação composto por TCA 0,1%, tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e iodeto de potássio 1 M, com leitura em 390 nm (Alexieva et al., 2001).

Enzimas antioxidantes

As amostras de material vegetal previamente coletadas e estocadas em freezer - 80°C serão maceradas em N_2 líquido e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM EDTA, 3 mM DTT e 4% PVPP. A mistura será centrifugada a 10.000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante será dividido em alíquotas, mantidas a -80 °C para serem utilizadas nos ensaios enzimáticos (Azevedo et al., 1998). A quantificação das proteínas solúveis totais será realizada conforme Bradford (1976).

Superóxido dismutase - SOD (EC 1.15.1.1):

A atividade da SOD será determinada em espectrofotômetro, onde a reação será conduzida em uma câmara de reação (caixa), sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W a 25°C. A mistura da reação consistirá de uma solução contendo 50 µl da amostra extraída em um meio de reação de 5 ml, contendo tampão fosfato de sódio, metionina, NBT, EDTA e riboflavina. A reação será colocada no interior da caixa evitando qualquer tipo de luz exterior, em seguida acende-se a luz no interior da caixa por 5 minutos, onde neste intervalo se formará o composto blue formazana pela fotoreação do NBT. As leituras serão realizadas a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977).

Catalase - CAT (EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase (CAT) será determinada em uma mistura contendo 1mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 25 mL de H_2O_2 (solução a 30%). A atividade será determinada monitorando o declínio de H_2O_2 na absorbância a 240 nm ao longo de 1 min (Cia et al., 2012). A atividade da CAT será expressa como $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Ascorbato peroxidase - APX (EC 1.11.1.11)

A atividade da APX será realizada por método espectrofotométrico, com leituras a 290 nm. A mistura de reação consistirá de uma solução contendo 650 µL tampão fosfato de potássio 80 mM pH 7,0; 100 µL ascorbato 5 mM; 100 µL EDTA 1 mM; 100 µL H_2O_2 1 mM e 50 µL de extrato, permanecendo em banho a 30°C. O H_2O_2 será adicionado na hora da leitura, que serão realizadas após um período de 1 min em cubetas de quartzo (Gratão et al., 2012).

Peroxidasas - POX (EC 1.11.1.7)

A atividade das peroxidases (POX) será determinada pelo método de Kar e Mishra (1976). Neste método, as enzimas contidas no extrato oxidam a guaiacol para produzir purpurogallina e reduzir o H_2O_2 fornecido ao meio. O meio reacional consistirá no extrato vegetal, 25 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 20 mM de ácido pirogálico, 20 mM de H_2O_2 e H_2SO_4 a 0,5%. A mistura será incubada a 25 °C durante 5 minutos. Em seguida, a reação será neutralizada pela adição de H_2SO_4 a 0,5% e a absorbância da mistura será monitorada durante 3 minutos e determinada a 420 nm. A atividade do POX será calculada a partir do coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ácido pirogálico) (Chance e Maehley, 1955), e considerando o aumento de 1 unidade (UA) de absorbância, os dados serão expressos em $\text{AU g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$.

Polifenol oxidase - PPO (EC 1.10.3.1)

A atividade será determinada pelo método espectrofotométrico baseado em uma taxa inicial de aumento na absorbância a 410 nm (Soliva et al. 2001). O meio reacional consistirá de solução tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), ácido pirogálico 0,1 M como substrato e extrato vegetal. O meio reacional é colocado em tubo de ensaio para fazer a homogeneização. Após isto, a mistura é rapidamente transferida para a cubeta e realizada a leitura na absorbância 410 nm a 25 °C por 5 min. Os dados serão expressos por $\text{AU g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$.

Glutathione peroxidase - GPX (EC 1.11.1.9)

A atividade de GPX será determinada adicionando o extrato vegetal a um meio reacional consistindo de 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 3 mM de EDTA, 0,24 U GR/mL, 10 mM de GSH, e 1 mM de azida sódica. Esta mistura será incubada a 37 °C durante 10 min. A reação será catalisada pela adição de 1,5 mM de NADPH e 1,5 mM H_2O_2 . A oxidação de NADPH será monitorada durante 5 minutos a 340 nm. A atividade enzimática será calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Anderson e Davis, 2004) e os resultados expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Glutathione reductase - GR (EC 1.6.4.2)

A glutathione reductase (GR) será determinada em uma mistura consistindo em 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) 1 mM de 5,00-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico), 1,0 mM de GSSG e 0,1 mM NADPH. A taxa de redução de GSSG será calculada por meio do monitoramento do aumento da absorbância a 412 nm durante 1 min a 30 °C (Carvalho et al., 2013). A atividade da GR será expressa como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Compostos não enzimáticos

Prolina:

Os teores de prolina livre serão determinados de acordo com o método descrito por Bates et al. (1973), que consiste em homogeneizar 0,5 g de massa fresca do material vegetal em 10 ml de ácido sulfossalicílico 3%. A solução homogeneizada será submetida a duas filtrações para eliminação de interferentes e diluída com ninhidrina ácida. Para o preparo da ninhidrina ácida dissolve-se 1,25g de ninhidrina ($C_9H_4O_3 \cdot H_2O$) em 30 ml de ácido acético glacial PA (CH_3COOH) e 20 ml de ácido fosfórico 6 M. Em tubos de ensaio serão colocados 2 ml do extrato filtrado que reagirão com 2 ml de ninhidrina ácida e 2 ml de ácido acético glacial, por 60 minutos em banho-maria à 100°C. Após esse tempo, o tubo de ensaio será colocado em um recipiente com gelo para finalizar a

reação, em seguida serão adicionados 4 ml de tolueno PA e a solução será homogeneizada agitando-se por 15 a 20 segundos. A leitura da absorbância das amostras será realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 520 nm. Para a curva de padronização, será utilizada solução estoque de prolina na concentração de 1mM de prolina PA e diluições seriadas em água destilada. Os teores de prolina livre serão expressos em µmol de prolina por grama de massa fresca.

Teor total de fenol

Um peso conhecido das amostras frescas de folhas será retirado e extraído com metanol frio a 85% (v / v) por três vezes a 0 °C. 0,5 mL de extrato será adicionado a 0,5 mL de reagente de Folin-ciocalteu, será agitado e deixado em repouso por 3 min. Em seguida, 1 mL de carbonato de sódio saturado será adicionado a cada tubo, seguido de água destilada, agitada e em seguida repousará por 60 min. A densidade óptica será determinada a 725 nm, utilizando espectrofotômetro como descrito por Danil e George (1972).

Forma e Análise dos Resultados

Os parâmetros avaliados serão submetidos ao teste de normalidade, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, para verificação da ausência de normalidade, seguido de transformações. Posteriormente, a análise de variância pelo teste F será realizada e as variáveis que apresentarem resposta significativa aos tratamentos serão submetidas ao teste de comparação de médias, aplicando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas serão realizadas utilizando Software especializado.

Ação 5. Seleção e autofecundação de matrizes de palma forrageira produtivas e resistentes a Cochonilha-do-carmim e de escama

A método de melhoramento empregado é o Método da Autofecundação, aplicada a variedades que se propagam por reprodução assexuada (multiplicação vegetativa de clones superiores). De acordo Ferreira (2006), segue as seguintes etapas: 1. Autofecundação das plantas superiores, e na época da colheita, coleta as sementes e mistura as sementes botânicas e posterior plantio das mesmas; 2 Seleções das novas plantulas ainda em casa e vegetação, transplante e multiplicação; 3. Ensaio preliminar; 4. Competição dos clones escolhidos no ensaio preliminar; e 5. Ensaio de recomendação de clones de palma forrageira.

Será adotado como ideótipo neste projeto as seguintes características: baixa agressividade de espinhos, resistência à Cochonilha-do-carmim e de escama, adaptação as condições edafoclimáticas do semiárido, alta produtividade e bons atributos bromatológicos como forragem.

Nas etapas 1 e 2 serão desenvolvidas três atividades: a) Autofecundação de plantas de cada clone superior selecionado; b) Colheita e beneficiamento dos frutos oriundos da autofecundação; c) Semeadura das sementes botânicas, obtenção e seleção inicial de plântulas, clonagem e multiplicação inicial das plântulas selecionadas.

A autofecundação será realizada manualmente em plantas nos pomares. De cada clone, serão colhidos 30 frutos maduros aleatoriamente, os quais serão caracterizados quanto ao comprimento, diâmetro, peso, número de sementes por fruto. A comparação do número de sementes por fruto será avaliada pelo teste qui-quadrado.

Ação 6. Seleção e autofecundação de matrizes promissoras de palma forrageira voltada para a qualidade físico-química de fruto (coloração mais avermelhada) e que sejam resistentes a doenças

A método de melhoramento empregado é o Método da Autofecundação, aplicada a variedades que se propagam por reprodução assexuada (multiplicação vegetativa de clones superiores). De acordo Ferreira (2006), segue as seguintes etapas: 1. Autofecundação das plantas superiores, e na época da colheita, coleta as sementes e mistura as sementes botânicas e posterior plantio das mesmas; 2 Seleções das novas plantulas ainda em casa e vegetação, transplante e multiplicação; 3. Ensaio preliminar; 4. Competição dos clones escolhidos no ensaio preliminar; e 5. Ensaio de recomendação de clones de palma forrageira.

Será adotado como ideótipo as seguintes características: baixa agressividade de espinhos, resistência à Cochonilha-do-carmim e de escama, adaptação as condições edafoclimáticas do semiárido, alta produtividade e bons atributos de qualidade de frutos e coloração avermelhada, menos de 200 sementes.

Nas etapas 1 e 2 serão desenvolvidas três atividades: a) Autofecundação de plantas de cada clone superior selecionado; b) Colheita e beneficiamento dos frutos oriundos da autofecundação; c) Semeadura das sementes botânicas, obtenção e seleção inicial de plântulas, clonagem e multiplicação inicial das plântulas selecionadas.

A autofecundação será realizada manualmente em plantas nos pomares. De cada clone, serão colhidos 30 frutos maduros aleatoriamente, os quais serão caracterizados quanto ao comprimento, diâmetro, espessura do pericarpo, peso, número de sementes por fruto, cor do fruto, peso de 100 sementes, e pesos do pericarpo e da polpa. A comparação do número de sementes por fruto será avaliada pelo teste qui-quadrado.

Ação 7. Avaliação de progênie S1 e selecionar as mais produtivas e resistentes as principais pragas e doenças

Nesta etapa, a avaliação será em campo com repetições e delineamento experimental. As parcelas serão constituídas por uma única planta. O delineamento experimental será o inteiramente casualizado e o número de repetições de cada tratamento será dependente do número de cladódios disponíveis de cada tratamento entre um mínimo de seis repetições e o máximo de 12 por tratamento. O espaçamento será de 2m x 1m, e os tratamentos culturais os normais da estação experimental do INSA.

Aos 6, 12, 18 e 24 meses serão avaliados a susceptibilidade as Cochonilhas-de-escamas e do carmim por meio de escala de nota variando de um a cinco, onde um representa ausência de ataque e cinco, morte da planta. Ao proceder estas avaliações será identificado os clones que estejam muito atacados pela Cochonilha-do-carmim, mas não apresentem sinais de murcha. Dois anos após o plantio, serão avaliados os seguintes caracteres: número de artigos/planta, altura da planta, maior largura das plantas e produção e teor de matéria seca. O corte, para estimativa seca será procedido respeitando os artigos primários. O teor de MS será determinado em estufa com circulação forçada de ar a 55 oC de temperatura e ao ser multiplicado pela produção de matéria verde, será obtida a produção de matéria seca dos clones. Serão selecionados para etapa seguinte os clones que atenderem aos critérios estabelecidos no ideótipo. Os dados serão submetidos a análise de correlação e de trilha considerando produção de matéria seca como variável primária.

Ação 8. Desenvolvimento de clones inter- e intraespecíficos produtivos de palma forrageira visando ampliar a base genética do programa de melhoramento da cultura

Aqui o método de melhoramento de escolha é Método da Hibridação, aplicada a variedades que se propagam por reprodução assexuada (multiplicação vegetativa de clones superiores). De acordo Ferreira (2006), segue as seguintes etapas: 1. Cruzamento entre as populações clonais superiores, e na época da colheita, coleta as sementes botânicas, mistura-as e, posteriormente, procede-se o plantio das mesmas; 2 Seleções de plantulas individuais ainda em casa e vegetação, transplante e multiplicação; 3. Ensaio preliminar; 4. Competição dos clones escolhidos no ensaio preliminar; e 5. Ensaio de recomendação de clones de palma forrageira.

Será adotado como ideótipo as seguintes características: baixa agressividade de espinhos, resistência à Cochonilha-do-carmim e de escama, adaptação as condições edafoclimáticas do semiárido, alta produtividade e bons atributos de qualidade de frutos e coloração avermelhada, menos de 200 sementes.

Nesta etapa, a avaliação será em campo com repetições e delineamento experimental. As parcelas serão constituídas por uma única planta. O delineamento experimental será o inteiramente casualizado e o número de repetições de cada tratamento será dependente do número de cladódios disponíveis de cada tratamento entre um mínimo de seis repetições e o máximo de 12 por tratamento. O espaçamento será de 2m x 1m, e os tratos culturais os normais da estação experimental do INSA.

Aos 6, 12, 18 e 24 meses serão avaliados a susceptibilidade as Cochonilhas-de-escamas e do carmim por meio de escala de nota variando de um a cinco, onde um representa ausência de ataque e cinco, morte da planta. Ao proceder estas avaliações será identificado os clones que estejam muito atacados pela Cochonilha-do-carmim, mas não apresentem sinais de murcha. Dois anos após o plantio, serão avaliados os seguintes caracteres: número de artigos/planta, altura da planta, maior largura das plantas e produção e teor de matéria seca. O corte, para estimativa seca será procedido respeitando os artigos primários. O teor de MS será determinado em estufa com circulação forçada de ar a 55 oC de temperatura e ao ser multiplicado pela produção de matéria verde, será obtida a produção de matéria seca dos clones. Serão selecionados para etapa seguinte os clones que atenderem aos critérios estabelecidos no ideótipo. Os dados serão submetidos a análise de correlação e de trilha considerando produção de matéria seca como variável primária.

Ação 9. Indução de linhagens haplóides usando cultura de micrósporo e óvulos não-fertilizados

As plantas doadoras serão selecionadas entre os acessos pertencentes ao banco de germoplasma do Instituto Nacional do SemiArido (INSA), localizado em Campina Grande, Paraíba, Brasil. Botões florais serão coletados na época da floração.

Cultura de óvulos não fertilizado in vitro

O estágio de desenvolvimento dos macrósporos será determinado indiretamente pela observação de anteras esmagadas coradas com 2% de aceto-carmin sob um microscópio. Os óvulos serão coletados quando os micrósporos estiverem no estágio de desenvolvimento uni-nucleado médio. Os botões florais serão esterilizados por imersão em etanol a 70% por 1 minuto e em solução de hipoclorito de cálcio a 1,5% por 10 minutos, seguidos por três lavagens com água destilada.

As pétalas e sépalas serão removidas de cada botão floral e os óvulos imaturos serão coletados e inoculados na superfície do meio basal descrito por Murashige e Skoog (1962), suplementado com 2,4-D/TDZ (0,5:0,5 mg.l⁻¹) e três concentrações de sacarose (0,09, 0,18 e 0,26 M). Os meios serão autoclavados a 121 °C por 20 min a uma pressão de 1,2 kgf.cm⁻². Cerca de 300-600 óvulos serão cultivados em cada placa de Petri de plástico estéril (90x9x15mm) contendo 15 ml de meio de cultura gelificado com 0,25% de Gelrite®.

As culturas serão incubadas a 24±2°C, alta UR, no escuro. Após 3 semanas, serão avaliados o número de óvulos responsivos, determinado pelo aumento do tamanho dos óvulos.

Conversão de embrião a plântula

Os óvulos aumentados serão transferidos para um novo meio de cultura MS basal suplementado com 2,4-D/TDZ (0,2:0,5 mg.l⁻¹) gelificado com 0,25% de Gelrite® e 0,09M de sacarose por 21 dias. Embriões e calos ginogênicos serão avaliados e transferidos a cada 21 dias para o mesmo meio de cultura basal MS sem reguladores de crescimento vegetal. As culturas serão incubadas a 24±2 °C, alta UR, sob um fotoperíodo de 16h, fornecidas com um fluxo de fótons a 30 µmol.m⁻².s⁻¹ por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Após 4 semanas, o número de embriões em desenvolvimento direta e indiretamente serão avaliados. Os brotos alongados serão submetidos ao enraizamento, em uma mistura de turfa, perlita e vermiculita (partes iguais v/v/v) em condições de sala de crescimento.

Análise por citometria de fluxo

Plântulas bem desenvolvidas serão selecionadas para determinar o nível de ploidia (veja Ação 3).

Análise estatística

Os resultados serão submetidos a uma análise de variância de dois fatores com o teste Tukey HSD de LS, realizado com o software Genes (Cruz, 2020) para determinar os efeitos principais e interativos das espécies de cactos e concentrações de sacarose nos níveis ginogênicos. O efeito dos três níveis de sacarose na conversão direta das plantas será determinado usando o teste-Z para diferenças de proporções.

Ação 10. Indução de linhagens poliploides in vitro a partir de plantas diplóides usando agentes anti-mitóticos (colchicina, orizalina e trifluralina)

Obtenção dos explantes

Explantes de cladódios jovens com aproximadamente 5 cm de comprimento, serão submetidos a desinfestação superficial com lavagem em água corrente por 20 minutos, imersão em álcool 70% durante 1 minuto e, finalmente, 10 minutos numa solução de hipoclorito de sódio acrescido de 4 gotas de Tween 20 durante. Em seguida, será realizada uma tríple lavagem em água destilada estéril. Os explantes (1 cm²), contendo uma aréola, serão inoculados em meio de cultura MS ou simplificado CK (composto por 0,84 g.L⁻¹ de Calcinit e 0,742 g.L⁻¹ de Kristalon, fertilizantes agrícolas usados em substituição aos macro e micronutrientes), totalizando dois meios de estabelecimento *in vitro*.

Indução à Poliploidia in vitro

Será conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com explantes de 10 acessos de palma, induzidos a poliploidia *in vitro*, através da imersão em soluções de colchicina em quatro concentrações (0, 5, 15 e 30µM), em 10 repetições, sendo cada repetição composta por 5 explantes, durante 15 dias, sob agitação em condições de escuro (envoltos em papel alumínio). Após exposição à colchicina, os explantes serão enxaguados por três vezes em água destilada autoclavada e inoculados em meio de cultura MS acrescidos de reguladores de crescimento (2 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de AIA), vitaminas (1 mL L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹), inositol (100 mg L⁻¹) e gelificados com ágar (6 g L⁻¹), sendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, conforme metodologia descrita

por (SILVA, 2017). Os cultivos serão mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $47 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Aos 60 dias será avaliada a sobrevivência e regeneração dos explantes (emissão de brotações), conforme metodologia descrita por (SILVA, 2017).

Determinação do nível de ploidia

Após a fase de aclimatização as mudas serão multiplicadas e posteriormente serão feita a certificação do sucesso da poliploidização por meio da contagem do número de cromossomos.

Multiplicação de genótipos poliploidizados

Os genótipos poliploidizados serão micropropagados, conforme metodologia descrita por (SILVA, 2017) e, posteriormente, serão aclimatizados em casa de vegetação. Após essa etapa serão multiplicados através de propagação assexuada e avaliados em ensaios de cultivo na estação experimental do INSA.

Ação 11. Redução do tempo de juvenildade de plântulas derivadas de cruzamentos inter- e intraespecíficos por meio de enxertia

Plântulas oriundas de sementes de hibridação sexual controlada serão postas para germinar em bandejas de plástico preenchidas com substrato PlantMax. Quando atingirem 10 cm de altura, serão coletadas e enxertadas em plantas em estágio reprodutivo no campo e em raquetes em estágio reprodutivo sob condições de laboratório.

Ação 12. Teste de clones e progênies S1 selecionados em diferentes condições ambientais e no Estado da Paraíba

Os clones previamente selecionados, em etapas anteriores, serão multiplicados na Estação Experimental INSA. Levando em consideração a necessidade de se ter 240 cladódios para que o ensaio possa ser avaliado em 2 municípios do Estado da Paraíba, a serem escolhidos.

O delineamento experimental a ser utilizado é o de blocos ao acaso, com quatro repetições. O espaçamento adotado será de 1,6m entre fileiras, com as plantas espaçadas de 0,5m dentro da fileira. A área total da parcela conterà três filas de 5m de comprimento, totalizando 24 m^2 e 30 plantas por parcela. A área útil da parcela será constituída pela fila central, eliminando uma planta de cada borda.

Serão avaliados todos os caracteres tidos como ideótipo descritos nos itens anteriores.

As análises de variância e testes de comparação de médias serão procedidas pelo software GENES (Cruz, 2006), com adoção do nível de significância de 5%. Os clones eleitos para o ensaio de recomendação devem atender aos ideótipos definidos no item.

Ação 13. Ações de desenvolvimento de produtos e mercado (dia de campo) da palma forrageira com diversas finalidades: forragem, frutífera, salada, medicinal e ornamental

Serão realizados dias de campo nas dependências do INSA, para apresentação dos produtos gerados nas diversas ações desenvolvidas no projeto, durante os anos de vigência do mesmo.

Ação 14. Formação de recursos humanos em fitomelhoramento, 01 Mestrando e 01 Doutorando, do Programa de Pós-graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba

Durante a vigência do projeto, serão treinados em melhoramento de palma forrageira 01 estudante de Mestrado e 01 de Doutorado, alunos do Programa de Pós-graduação em Agronomia e um bolsista DCR, com bolsa da SUDENE.

Subprojeto 2: estratégia de manejo para controle da cochonilha-de-escama em palma forrageira

Ação 1. Determinação do nível de infestação da Cochonilha-de-escama em quatro variedades de palma forrageira em três propriedades no Estado da Paraíba e três propriedades no Rio Grande do Norte

Será feita uma avaliação do nível de infestação da Cochonilha-de-escama por “material” já em cultivo em seis diferentes campos de produção (selecionados pelo INSA), cujo resultado será o padrão de comparação para as táticas a serem empregadas durante toda a abrangência do projeto. Essa avaliação será quinzenal para cada campo de produção.

Serão avaliadas 100 plantas para cada material em cada município totalizando 2.400 plantas a serem avaliadas. A avaliação constará de uma análise na raquete terciária, considerando três níveis: 0 (sem infestação) 1 (até 50 % de infestação) e 2 (acima de 50% de infestação na raquete), considerando para efeito de análise de infestação a presença de insetos vivos na raquete.

Esses dados serão computados e analisados para determinação do nível da infestação inicial por material, propriedade e Estado.

Ação 2. Biologia de D. echinocacti criada em diferentes variedades de palma forrageira

Criação de manutenção de D. echinocacti em plantas de diferentes variedades de palma forrageira cultivadas em casa de vegetação

Inicialmente serão estabelecidas/mantidas, no interior de casa-de-vegetação, colônias de *D. echinocacti*, criados em plantas de palma forrageira cultivadas em 144 vasos plásticos com capacidade de 20 litros, contendo solo misturado a 30% de esterco bovino. As plantas serão divididas em 12 grupos de igual número de vasos, sendo, 24 para cada variedade de palma (12 vasos com plantas infestadas e 12 isentas do inseto), quais sejam: Orelha-de-Elefante-Mexicana (*Opuntia stricta*), Orelha-de-Elefante-Africana (*Opuntia undulata*), palma Miúda ou Doce (*Nopalea Cochenillifera*), além da IPA Sertânia, Baiana ou Mão-de-Moça (*Nopalea* spp.) e a Gigante (*Opuntia ficus indica*).

A casa de vegetação dispõe de divisórias de modo a formar quatro quadrantes de 36 m^2 e está equipada com bancadas de aço para suporte dos vasos/plantas. As plantas serão permanentemente monitoradas quanto à infestação por *D. echinocacti* obtidas inicialmente em campo e livres de agentes de controle biológico por ocasião do acesso à casa de vegetação.

A referida estrutura de criação de manutenção da Cochonilha-de-escama e o cultivo de plantas de forrageira disponibilizará continuamente raquetes de palma e/ou plantas e insetos, necessários à realização dos experimentos voltados ao estudo dos aspectos biológicos desse inseto em laboratório bem como as pesquisas relativas ao desenvolvimento de uma técnica de produção massal de, ao menos, um agente de controle biológico (*acb*) dessa praga.

Determinação dos parâmetros biológicos de *D. echinocacti* em diferentes variedades de palma forrageira em laboratório

Estudos relativos à biologia da Cochonilha-de-escama serão contemplados com vista à definição dos seus aspectos biológicos e consequente desenvolvimento/potencial de danos em diferentes variedades de palma forrageira. Os trabalhos serão realizados no laboratório de Entomologia com suporte de plantas cultivadas em casa-de-vegetação.

Em cada variedade de palma estudada será determinado o ciclo total de ovo-adulto de *D. echinocacti* além dos seguintes parâmetros biológicos: duração dos estágios imaturos (ovo e ninfa), determinação do número de instares, longevidade das fêmeas, fecundidade e viabilidade dos ovos.

Para a determinação dos parâmetros biológicos, durações dos estágios de ovo (período de incubação), ninfas e o número de instares; 200 ovos obtidos do dia, de fêmeas em pleno processo controlado de postura, serão retirados sob as escamas das cochonilhas e colocados em círculos de 90 mm de diâmetro (arenas), previamente demarcados em raquetes não infestadas. Os círculos (total de 04) serão circundados em suas bordas com um cinturão de vaselina para evitar a fuga das ninfas móveis de primeiro estágio de desenvolvimento. Em cada círculo serão dispostos 50 ovos. A raquete será inserida em um saco plástico para evitar dessecação dos ovos e, posteriormente, acondicionada em câmara BOD regulada à $27 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 12 h.

As avaliações dar-se-ão diariamente em horário padronizado, aonde serão anotados os dados relativos à eclosão dos ovos, data e hora da fixação das ninfas móveis e aparecimento de novas escamas (sinal de mudança de instar).

Quanto aos parâmetros biológicos, longevidade das fêmeas, fecundidade e viabilidade dos ovos, círculos semelhantes serão formados sobre raquetes recém infestadas com *D. echinocacti*, ou seja, com espécimes de idade conhecida. Para tanto, serão observadas cinco arenas (círculos) contendo 20 cochonilhas a partir da constatação do seu estágio em terceiro instar. Uma sexta arena será instalada simultaneamente às demais contendo, no mínimo, 20 fêmeas, a fim de subsidiar as observações diárias passíveis de comprovar o início do período de oviposição.

As observações dar-se-ão por meio do deslocamento cauteloso das escamas de duas cochonilhas/dia com auxílio de um estilete. Assim, ao se constatar os primeiros ovos sob as escamas, será considerado, o dia de início de postura das fêmeas nas dispostas nos quatro círculos. A partir de então, serão quantificados, diariamente, o número de ninfas móveis observadas em cada arena. Paralelamente, serão registrados os dados diários que permitirão mensurar a fecundidade de cada fêmea avaliada, a viabilidade dos ovos e, finalmente, a sua longevidade.

Ação 3. Seleção de pelo menos um material resistente à Cochonilha-de-escama

- Teste com chance de escolha

Os ensaios de resistência serão conduzidos em laboratório e casa de vegetação do setor de Entomologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Nesse teste será avaliada a atratividade e a capacidade de fixação dos insetos nos cladódios das plantas dos diferentes genótipos de palma. Serão utilizados fragmentos retangulares das raquetes dos genótipos de palma previamente seccionados. Os recipientes utilizados para a realização deste ensaio constaram de arenas, com fundo revestido por isopor no qual serão feitos orifícios circulares equidistantes do centro contendo os pedaços das raquetes dos genótipos utilizados. Cada arena constará de uma repetição, num total de 10 repetições/tratamento, avaliando-se a atratividade e a fixação dos insetos com 24 e 48 horas após a liberação dos mesmos, por meio do número de insetos presente em cada porção da planta.

- Teste sem chance de escolha

Serão utilizadas placas de Petri de 10 cm de diâmetro, que acomodarão os cladódios de palma juntamente com insetos de primeiro instar, recém-eclodidos, num total de 10 repetições/tratamento, onde cada placa constituirá uma repetição. Nesse teste será avaliado a permanência e sobrevivência dos insetos nos genótipos num período de 24, 48 e 72 horas após a liberação dos mesmos. O número de insetos a ser colocado em cada placa será determinado em testes preliminares.

Ação 4. Avaliação da eficiência de óleos vegetais no campo e teste de seletividade desses óleos sobre joaninhas predadoras em condições de laboratório

A eficiência do uso de óleos vegetais sobre a cochonilha será avaliada em função da taxa de mortalidade do inseto comparada ao tratamento testemunha (sem uso de produto) e estabelecido em função da fórmula de Abbott. Para avaliação da seletividade serão avaliados os efeitos letais e subletais dos insetos avaliados. Duas fases de desenvolvimento das joaninhas serão avaliadas, ninfas de primeiro instar e adultos recém emergidos. Para cada experimento, 100 insetos serão utilizados por tratamento, cada um sendo considerado uma repetição. Para pulverização, será utilizada a Torre de Potter (Burkard Scientific) que permite uma aplicação homogênea por toda a superfície. Duas formas de exposição serão realizadas: aplicação direta sobre os insetos e efeito de contato. Serão avaliadas a sobrevivência (efeito letal) e a predação (efeito subletal) das duas fases dos insetos avaliadas. Os ensaios terão distribuição inteiramente casualizada. Análise de sobrevivência de Kaplan Meier será aplicada para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a mortalidade dos insetos.

Ação 5. Desenvolvimento de uma técnica de criação da joaninha, *Coccidophilus citricola*, em condições controladas de laboratório

A joaninha *C. citricola* será priorizada nesse estudo em razão da observação de sua abundância e predominância nas diferentes áreas de produção de palma forrageira, independente da região de produção, estado e variedade de palma cultivada.

Ensaio preliminares em laboratório relativo à criação de *C. citricola* utilizando-se a Cochonilha-de-escama, criadas em raquetes de palma, como hospedeiro desse "*acb*" tem se revelado promissor para o atendimento dos trabalhos de pesquisas em laboratório, bem como, para efeito demonstrativo aos técnicos e produtores em eventos transferência de tecnologias, tendo em vista a importância dos *acb*'s presentes no campo, os quais, quando preservados, atuam como exímios reguladores da população dessa praga. As joaninhas são insetos predadores inespecíficos cuja base de alimentação contempla ovos e larvas de diferentes espécies de insetos e ácaros.

A pesquisa tem como objetivo gerar informações sobre a capacidade de criação e produção em escala dessa espécie em cativeiro (gaiolas) sendo alimentada com cochonilhas em raquetes de palma ou outra espécie alternativa, a exemplo de ovos de *Anagasta kuehniella*.

Para o desenvolvimento do sistema de criação do predador, far-se-á necessária, a condução de trabalhos em duas etapas. A primeira etapa terá por objetivo a determinação da melhor relação hospedeira (Cochonilha-de-escama ou ovos de *A. kuehniella*) e o agente de controle biológico, *C. citricola*. Para

tanto será mensurado, mediante aplicação de metodologia apropriada, a quantidade de espécimes do predador produzido e a sua qualidade (capacidade de predação das gerações seguintes).

- Criação da joaninha em colônias de Cochonilhas-de-escama, *D. echinocacti*

Os trabalhos serão desenvolvidos no interior de uma sala de criação com área de 7,5 m² a qual está equipada com estantes metálicas, para o apoio dos vasos contendo as plantas de palma forrageira (variedade Orelha de elefante mexicana). A sala de criação dos insetos será regulada na temperatura de 25 ± 1°C, 60± 10% de UR e fotofase de 12h.

As plantas serão cultivadas em casa de vegetação segundo descrito em 8.4.2.1. A infestação das mesmas com as espécies de *D. echinocacti* dar-se-á por contato direto de raquetes infestadas, dispostas em formato de sanduiche, proveniente do campo e/ou utilizando-se tabletes quadrados de palma (unidades de infestação), com dimensões de 5,0 x 5,0 cm, densamente infestados com cochonilhas adultas em fase de postura. Esses tabletes serão obtidos (recortados) de raquetes infestadas sob controle dispostas em gaiolas no laboratório, as quais funcionarão como suporte às reinfestações de raquetes/plantas no laboratório e/ou casa de vegetação. Os tabletes serão fixados às raquetes alvos de infestação por meio de “palitos de dente”.

Uma vez infestadas com a praga, as plantas nos vasos serão dispostas no interior de gaiolas entomológicas revestidas em plástico e tela antiafídeo com dimensões de 45x45x75 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente).

A colonização das plantas infestadas com as cochonilhas no interior dessas gaiolas será feita inicialmente com 20 espécimes da joaninha *C. citricola*/gaiola. Os insetos serão coletados previamente em campos de produção de diferentes áreas produtoras da palma forrageira no RN e/ou nas estações experimentais da Emparn. Em casa de vegetação, gaiolas com plantas infestadas pela cochonilha serão colonizadas e mantidas com esse *acb* a fim de atender as demandas experimentais. As plantas infestadas com *D. echinocacti* e colonizadas com os espécimes joaninha serão dispostas em grupos de 10 gaiolas.

Nessa etapa serão realizadas inspeções semanais em cada planta a fim de observar o comportamento joaninha frente ao seu hospedeiro. Em cada planta serão etiquetadas duas raquetes em processo de reinfestação (raquetes com alta infestação ninfas entre 2ª e 3ª) nas quais, avaliar-se-ão a mortalidade média das referidas ninfas em duas áreas distintas de 6,25 cm².

Além da avaliação do potencial de controle biológico exercido por *C. citricola* sobre as cochonilhas, será avaliada a capacidade de reprodução de cada espécie sob essas condições de criação. Para tanto, serão observados e avaliados os seguintes parâmetros biológicos: números médios de ovos, larvas e de adultos por raquete a partir da segunda geração do *acb*.

- Criação da joaninha em ovos de *A. kuehniella*

Há de considerar, no entanto, que a otimização de uma técnica de criação de insetos voltada à produção de *acb*'s demanda estudos que minimizem recursos humanos, tempo de criação, espaço físico e recurso financeiro. Nesse sentido, tem-se envidado esforços para a identificação de um hospedeiro alternativo que substitua níveis tróficos envolvidos no desenvolvimento desses organismos.

A utilização de ovos da mariposa *A. kuehniella* tem sido recomendada para a produção de inúmeros *acb*'s em laboratórios e empresas de produção e comercialização de inúmeras espécies de agentes de controle biológico de pragas em todo o mundo. A sua produção massal em condições controladas em laboratório é de domínio público, facilmente replicado e de fácil operacionalização.

Estudos prévios de criação da *C. citricola* foram desenvolvidos em parceria com o laboratório de Entomologia do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP. Os resultados preliminares voltados à criação da joaninha são promissores, necessitando, no entanto, estudos complementares mais aprofundados, com vistas ao incremento de sua reprodução, quando alimentadas com a nova dieta, passível de garantir novas gerações desse “*acb*” que assegurem a sua criação massal em ambientes controlados.

A estrutura prevista em casa de vegetação para a criação do inseto-praga e a joaninha possibilitará a disponibilização de espécimes de *C. citricola* necessários à realização dos experimentos voltados a sua criação massal em ovos da mariposa *A. kuehniella*. A parceria com o referido laboratório permitirá a disponibilidade contínua de ovos desse hospedeiro de agentes de controle biológico. Espécimes das joaninhas serão criados no interior de 20 placas de Petri (13 cm de diâmetro), forradas com papel filtro ao fundo, sobre o qual serão ofertados 2 gramas de ovos.

Em cada arena de criação (placa de Petri), serão inseridos 10 espécimes de *C. citricola*. Ainda no interior de cada arena, serão colocados, aleatoriamente em seu interior, 04 retângulos de papelão corrugado como possível suporte a postura das joaninhas. A reposição da dieta (ovos) será indicada segundo observações diárias da criação.

Uma vez constatada as primeiras posturas de *C. citricola*, os suportes com os ovos serão transferidos para novas placas de Petri, contabilizados os ovos, devidamente etiquetadas e dispostas no interior de BOD regulada à 27 ± 1 °C; UR: 60 ± 10%; Fotofase: 12 h. As posturas serão observadas diariamente quanto à viabilidade dos ovos. Uma vez eclodidos, as larvas obtidas serão submetidas ao mesmo ciclo de criação descrito por três gerações subsequentes.

A avaliação dos parâmetros relativos ao desempenho das joaninhas alimentadas com ovos de *A. kuehniella* serão os mesmos utilizados quando de sua criação em colônias de *D. echinocacti*.

Uma vez constatada o desempenho do predador *C. citricola* quanto ao seu potencial de controle biológico em laboratório, o modelo do sistema de criação será submetido à validação (segunda etapa) em plantas infestadas com a Cochonilha-de-escama no interior da casa de vegetação, cuja produção dar-se-á em escala maior e continuada. Para tanto, serão dispostos 20 vasos/quadrante com plantas infestadas com a cochonilha, totalizando 80 plantas apresentando, no mínimo, duas raquetes em processo de reinfestação acelerada com ninfas em 2ª/3ª instares.

Nos quadrantes 1 e 2 serão liberadas, respectivamente, 50 e 100 joaninhas adultas, recém emergidas, de uma criação de manutenção em cochonilhas no laboratório e, nos outros dois, 3 e 4, liberar-se-ão mais 50 e 100 espécimes, respectivamente, em igual condições de desenvolvimento, oriundos da criação em ovos de *A. kuehniella*.

A avaliação do desempenho do *acb* no controle da cochonilha, *D. echinocacti*, em condições de semi-campo seguirá o mesmo procedimento descrito em 8.4.5.1.

Ação 6. Uso do consórcio da palma com sorgo forrageiro

Será selecionada uma área do plantio corresponde a 25% da área a ser avaliada para plantio de sorgo forrageiro intercalado a cada 3 linhas da palma forrageira, para cada “variedade” de palma a ser estudada, resultando no tratamento com e sem consórcio. A avaliação da infestação nesse tratamento será feita antes e após as plantas de sorgo atingirem a mesma altura das plantas de palma forrageira.

Ação 7. Uso de indutor de resistência na palma forrageira

Serão utilizados nutrientes a base de silício e potássio aplicados em 3 diferentes dosagens (a serem definidas em pré teste em função da fitotoxicidade) em 10 plantas de cada variedade. Serão feitas três aplicações, logo após a avaliação da infestação inicial, após 60 e 120 dias da primeira avaliação.

A avaliação da infestação da cochonilha será feita considerando a mesma metodologia utilizada no item 8.4.1, e será feita a cada 30 dias até 180 dias da primeira aplicação do nutriente.

Subprojeto 3: manejo integrado de doenças em palma forrageira no semiárido

Os experimentos *in vitro* serão realizados no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitossanidade do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB), localizado no município de Areia-PB.

Ação 1. Obtenção das amostras

As amostras de raízes e parte aérea de palma com sintomatologia de quaisquer doenças serão coletadas em áreas produtoras de palma no Semiárido.

Todas as amostras serão previamente analisadas, através de observação direta, com auxílio de lupa estereoscópica e exame a fresco, através da preparação de lâminas e visualização em microscópio ótico.

O material trazido do campo será inicialmente lavado com água e sabão, procedendo-se imediatamente a desinfestação em álcool etílico (70%) por um minuto. Em seguida, as raquetes serão imersas por três minutos em uma solução de hipoclorito de sódio (4,0%), e sendo por fim enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada (ADE). O material será posto sobre papel de filtro esterilizado durante cinco minutos, à temperatura ambiente, para retirar o excesso de água e só a partir de então as amostras serão submetidas à análise sanitária pelo emprego do Blotter-test.

Ação 2. Análise sanitária (Blotter-test)

Neste procedimento, fragmentos provenientes das partes infectadas das raquetes serão distribuídos de forma igualmente espaçada em placas de Petri contendo uma câmara úmida constituída por três folhas sobrepostas de papel de filtro umedecidas com água destilada esterilizada (ADE).

As placas serão mantidas em ambiente de incubação por oito dias, sob temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação natural (NEERGARD, 1979).

Decorrido esse período, o material que exibir contaminação microbiana será observado e analisado sob microscópio óptico e estereoscópico, procedendo-se a identificação do microrganismo e determinando-se a percentagem de incidência de cada um deles.

Ação 3. Identificação dos fitopatógenos e isolamento de fungos fitopatogênicos

A identificação dos fungos será realizada sob microscópio óptico, através das observações de estruturas como micélio, conídios e esporos, confrontando-as com as descrições da literatura (MENEZES; OLIVEIRA, 1993; CARLILE; WATKINSON, 1996; ALMEIDA, 1998; NEUFELD, 1999; FISHER; COOK, 2001).

A partir das colônias fúngicas desenvolvidas e devidamente identificadas, far-se-á, em câmara de fluxo laminar o isolamento e cultivo destes microrganismos.

Os fungos serão cultivados em placas de Petri, em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) estéril. Após sucessivas repicagens, serão obtidas colônias puras dos fungos, que serão avaliadas diariamente quanto à morfologia através da pigmentação, textura, consistência e forma do verso e reverso das colônias desenvolvidas. As colônias serão armazenadas sob refrigeração.

A identificação dos nematoides será realizada após dois procedimentos de extração de espécimes das raízes das plantas. O primeiro, usado para nematoides sedentários, consiste na dissecação de galhas radiculares com auxílio de um estilete, até a completa retirada da fêmea do nematoide. O segundo, usado para nematoides migradores seguirá metodologia proposta por Coolen & D'Herde (1972). Uma vez extraídos, os nematoides serão colocados em lâminas de microscopia e visualizados sob microscópio óptico. A identificação será realizada com o auxílio de uma chave dicotômica (FREITAS et al., 2012).

Ação 4. Tratamentos de plantas de palma com óleos vegetais

Nos ensaios descritos a seguir, serão empregados os seguintes tratamentos: óleos essenciais de T0 controle água destilada esterilizada (ADE), T₁ - capim limão, T₂ - manjerição, T₃ - eucalipto, T₄ - erva-doce, T₅ - cravo, T₆ - mamona, na concentração de 1%, diluídos em água destilada, acrescido de Tween 20.

-Ensaio *in vitro*

Crescimento micelial

Neste ensaio serão distribuídos 20 mL de batata dextrose ágar (BDA) por placa de Petri. Uma vez ocorrida a solidificação do meio, será efetuado o plantio, no centro da superfície do meio de cultura, de discos miceliais de aproximadamente 5 mm de diâmetro, retirados das margens de colônias fúngicas jovens isoladas de palma forrageira (FARIAS, 2004).

As placas serão transferidas para um ambiente de incubação à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), sendo realizado, a cada 24 horas, durante oito dias, a medição, por meio de uma régua milimetrada, do diâmetro das colônias em dois sentidos diametralmente opostos e realizado o cálculo da média por placa dessas duas medidas (ODDS, 1980).

Os dados deste experimento serão plotados para obtenção de uma equação de regressão linear simples ($y = a + bx$), conforme procederam Benício et al. (2003), sendo o tempo (dias) a variável independente (x); o crescimento micelial (diâmetro final das colônias, cm) a variável dependente (y); e 'a' o diâmetro inicial das colônias. A taxa de crescimento micelial será determinada pelo coeficiente de regressão (b).

Também será calculado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), utilizando a fórmula de Maguire (1962): $IVCM = (D - D_a)/N$, em que IVCM = Índice de Velocidade de Crescimento Micelial, D = Diâmetro médio atual, D_a = Diâmetro médio do dia anterior, e N = Número de dias após a inoculação.

O delineamento experimental consistirá no inteiramente casualizado, com cinco repetições. A análise estatística consistirá em Análise de Variância empregando-se o Teste F, sendo as médias comparadas entre si pelo Teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Germinação de esporos

Uma suspensão de esporos será obtida a partir de colônias puras com oito dias de desenvolvimento em BDA, no qual serão adicionados 20 mL de ADE a cada placa de Petri. Com o auxílio de uma escova de cerdas macias, será realizada a raspagem das colônias fúngicas, conforme metodologia descrita e realizada por Souza et al. (2007). O material será então filtrado através de duas camadas de gaze esterilizada e transferido para tubos de ensaio também esterilizados, sendo em seguida armazenados à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

A concentração dos esporos será determinada pela contagem dos mesmos em Câmara de Neubauer (hemacitômetro), sendo o resultado final expresso em conídios/mL (MUNKVOLD et al., 1997; BORGES et al., 2001).

Os tubos de ensaio, com os esporos em suspensão, serão tampados com chumaços de algodão esterilizado e mantidos à temperatura ambiente por 24 horas, com leituras e contagem do número de esporos germinados e não germinados em intervalos de 6 horas (CATARINO et al., 1991).

O delineamento experimental será o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Os resultados, expressos em porcentagem, serão analisados por Modelos Lineares Generalizados, com comparação de médias pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Ação 5. Teste de patogenicidade

Para avaliação da patogenicidade dos isolados obtidos, serão seguidos os postulados de Koch, sendo utilizadas raquetes saudas, desinfestadas previamente como descrito anteriormente.

Sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, em raquetes saudas serão selecionados cinco pontos e efetuados ferimentos de aproximadamente 3 mm de profundidade, com auxílio de estilete flambado. Em cada ponto selecionado será depositado um disco de BDA com 5 mm de diâmetro contendo estruturas dos fitopatógenos isolados e identificados. No tratamento controle (testemunha) serão depositados na superfície dos ferimentos discos de ágar sem o inóculo, apenas BDA estéril. As raquetes inoculadas e o controle serão mantidos à temperatura ambiente em câmaras úmidas (interior de bandejas plásticas umedecidas com ADE e vedadas com filme plástico) por um período de 15 dias, sendo observadas diariamente para verificação do aparecimento de sinais e sintomas. A partir do surgimento de quaisquer lesões, serão retirados pequenos fragmentos de tecido vegetal e plaqueados em BDA, para reisolamento dos patógenos e confirmação de que as lesões apresentadas foram realmente causadas pelos patógenos inoculados (LUCAS et al., 1992; NECHET e ABREU, 2002; MENDES et al., 2005).

Para a identificação dos patógenos serão adotados critérios estabelecidos internacionalmente (ROSSMAN et al., 1994), com base nas observações micromorfológicas das culturas.

O delineamento experimental será inteiramente casualizado com cinco repetições. Para a análise estatística, os resultados serão avaliados empregando-se o Teste de Tukey a 5% de probabilidade, para comparação das médias.

Ação 6. Determinação do grau de severidade de cada doença

Raquetes saudas de palma forrageira pré-tratadas em solução de hipoclorito de sódio 4,0% por cinco minutos serão inoculadas artificialmente com suspensão de esporos (concentração de $1,00 \times 10^7$ conídios/mL) dos fitopatógenos identificados e incubadas à temperatura ambiente.

Após 30 dias de incubação as raquetes serão observadas sob microscópio estereoscópio, para determinação do grau de severidade da doença com base no percentual de área de tecido lesionado, ou seja, acometido por quaisquer sintomas patológicos.

O grau de severidade será avaliado através de uma escala de notas estabelecida de acordo com a sintomatologia desenvolvida ao final do período de exposição, no qual se estabeleceu uma interação planta-patógeno (JUNGHANS et al., 2003).

Considerando a distribuição dos sinais e sintomas nos quadrantes de cada raquete, definiu-se a seguinte escala de notas, adaptada de Michereff et al. (2000) e Junghans et al. (2003):

- **Nota 0 (N_0)** = cladódio sem sintomas de doença; **Nota 1 (N_1)** = até 5 pequenas pontuações (manchas) da doença nos cladódios (5% da área da raquete) ou presença de mancha na área de inserção da raquete de até 2 cm de raio; **Nota 2 (N_2)** = entre 6 a 10 pontuações (manchas) na raquete (10%) ou mancha na área de inserção da raquete de até 5 cm de raio; **Nota 3 (N_3)** = quando mais de 10 manchas pequenas se unem, formando uma mancha maior (coalescência) ou mancha na área de inserção com mais de 5 cm de raio; **Nota 4 (N_4)** = manchas coalescentes, com mais de 2 cm de diâmetro, cobrindo aproximadamente metade da raquete ou expansão da mancha desde a área de inserção até aproximadamente metade da área da raquete; **Nota 5 (N_5)** = mais da metade da raquete afetada pela doença.

O delineamento experimental consistirá no inteiramente casualizado com cinco repetições. Para a análise estatística, os resultados serão avaliados empregando-se os Modelos Lineares Generalizados e o Teste Qui-Quadrado (χ^2), a 1% de probabilidade, para comparação das médias.

Ação 7. Estudo epidemiológico de doenças em palma

Após a seleção das propriedades para a instalação das unidades experimentais em cada município, será implementado o monitoramento de doenças, realizando-se um amplo levantamento acerca das populações fitopatogênicas incidentes em palma forrageira, bem como das doenças resultantes desta interação, sob a influência do meio ambiente e da interferência humana.

Esses estudos epidemiológicos envolverão o ciclo, o desenvolvimento e a evolução da doença no campo, descrição de toda a sintomatologia, formas de disseminação, formas de resistência do hospedeiro e do patógeno, avaliação dos prejuízos absolutos e relativos causados pelas doenças na cultura, inclusão de medidas sanitárias alternativas de controle das doenças, bem como análise do estabelecimento e da eficiência técnica e econômica de estratégias de controle das doenças e aperfeiçoamento para a proteção da cultura de palma forrageira.

Será determinado o grau de severidade de cada doença diagnosticada, da patogenicidade de cada microorganismo identificado e da longevidade *in vivo* dos esporos, em condições de campo, ou seja, sob populações do hospedeiro, correlacionando o progresso da doença no espaço e no tempo.

O ensaio seguirá o delineamento experimental em blocos ao acaso, com oito tratamentos e quatro repetições (blocos), sendo a comparação entre os tratamentos analisado segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ação 8. Avaliação da intensidade de doenças

Na avaliação da intensidade das doenças serão considerados dois índices: incidência (porcentagem de raquetes amostradas apresentando a doença) e severidade (extensão da doença na raquete).

Serão selecionadas propriedades rurais de plantio de palma para realização do estudo. Em cada área inspecionada, será demarcada uma área de 100m² (10m x 10m), onde serão acompanhadas 20 plantas por tratamento, ao longo de dois anos, e colhidas ao acaso raquetes de diferentes partes das plantas amostradas, perfazendo um total de 200 raquetes por área estudada.

A incidência será determinada pela porcentagem de plantas com sintomas da doença em relação ao total de plantas avaliadas, enquanto a severidade será estimada nas plantas doentes através da porcentagem de área foliar (entende-se folha como cada raquete ou cladódio) lesionada por doenças, contando com o auxílio de escalas diagramáticas e de notas.

Para verificação das espécies fitopatogênicas predominantes em cada localidade, será efetuado o isolamento em laboratório de fragmentos de lesões das raquetes acometidas. Posteriormente, serão feitas preparações microscópicas e observadas ao microscópio ótico, sendo efetuadas as identificações.

Ação 9. Eficiência de controle com extratos vegetais

Após realização de todo o estudo epidemiológico e ensaios *in vitro*, os tratamentos serão aplicados nas áreas previamente demarcadas.

Após 30 dias da pulverização as raquetes serão novamente colhidas ao acaso e realizada a avaliação da intensidade das doenças, considerando-se a incidência e o grau de severidade (adoção da escala de notas anteriormente descrita), bem como a determinação das taxas de infecção e das curvas de progresso das doenças após os tratamentos, com o objetivo de se detectar a eficiência dos produtos pelo efeito preventivo no ataque ou pelo poder de penetração no interior das colônias e consequente morte dos patógenos.

Será empregado o delineamento experimental em blocos ao acaso, com 08 tratamentos e quatro repetições (blocos), sendo feita a comparação entre os tratamentos analisados segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ação 10. Controle biológico de patógenos em palma forrageira

Plantas de palma forrageira nas áreas previamente selecionadas serão tratadas com antagonistas comerciais, dos gêneros *Trichoderma* e *Bacillus* e a metodologia de avaliação será semelhante àquela utilizada para os extrato vegetais. Os tratamentos serão compostos por T1 - Testemunha, composta pelas sementes tratadas com ADE; T2 - Trichodel® (0,5 mL); T3 - Trichodel® (1,0 mL); T4 - Trichodel® (1,5 mL); T5 - Trichodel® (2,0 mL); T6 - Bactel® (2,0 mL); T7 - Bactel® (2,5 mL); T8 - Bactel® (3,0 mL); T9 - Bactel® (3,5 mL) diluídos em 100 mL de ADE.

Será empregado o delineamento experimental em blocos ao acaso, com 08 tratamentos e quatro repetições (blocos), sendo feita a comparação entre os tratamentos analisados segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ação 11. Resistência genética de genótipos de palma forrageira aos nematoides

Os testes serão conduzidos em condições de casa de vegetação, no Departamento de Fitotecnia e Ciências Ambientais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. O principal gênero de nematoide encontrado em associação com a palma forrageira será utilizado nos testes de resistência genética.

Os nematoides serão multiplicados em plantas de tomate, da cultivar Santa Clara, mantidos em vasos de polietileno de 3 L contendo solo esterilizado. As plantas serão mantidas no solo infestado com nematoides por noventa dias. Quando então, será realizada a extração dos ovos, segundo metodologia proposta por Bonetti & Ferraz (1981). A suspensão de ovos será calibrada, com o auxílio de uma lâmina de Peters e um microscópio óptico, para conter 1000 ovos por mL de suspensão.

Para a instalação do experimento, raquetes de 10 genótipos fornecidos pelo INSA serão transplantadas para vasos de polietileno de 5 L de capacidade, contendo solo esterilizado. Quinze dias após o transplante, o solo de cada vaso será infestado com 5 mL da suspensão de ovos do nematoide, contendo 5.000 ovos.

O experimento será conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento (genótipo de palma). As plantas permanecerão nos vasos por 60 dias, quando serão avaliados o Índice de galhas (IG) e o Fator de reprodução (FR), seguindo metodologia proposta por Charchar et al. (2003) e Oostembrink (1966) respectivamente.

Os dados obtidos no experimento serão submetidos à análise de normalidade e homogeneidade de variâncias, usando, respectivamente, os testes de Shapiro-Wilk e Levene. Será realizada análise de variância e as médias dos tratamentos serão comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ação 12. Determinação da atividade de enzimas relacionadas a respostas de defesa em plantas

Será avaliada a atividade de enzimas sabidamente envolvidas no processo de resistência induzida.

- **PAL (Fenilalanina amônia-liase)**

Para a análise de fenilalanina amônia-liase serão coletados e transferidos imediatamente para banho de gelo 300 mg de folhas das diferentes espécies vegetais utilizadas como modelos de indução de resistência, os quais serão macerados em gral de porcelana, em nitrogênio líquido, contendo 1 mL de tampão fosfato (6 M). Os macerados serão transferidos para microtubos, identificados e mantidos em banho de gelo até o momento da extração das proteínas. As amostras serão centrifugadas em microcentrífuga a 14000 rpm durante cinco minutos, a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante será transferido para novo microtubo, identificado e armazenado até o momento da análise da atividade de enzimas. Na quantificação da PAL será utilizado a L-fenilalanina como substrato, a uma concentração de 6mM em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,0) e 200mL de cada amostra. A reação será incubada por 1h a 37°C, em banho-maria. Após esse período, será adicionado 0,05mL de ácido clorídrico para paralisar a reação, sendo realizada a leitura da absorbância da reação a 290 nm em espectrofotômetro, com os valores expressos em mg/mL de ácido cinâmico. Para a construção de curva padrão serão utilizadas concentrações conhecidas de ácido cinâmico (REDMAN et al., 1999).

- **Peroxidases**

O extrato enzimático, obtido para análise da fenilalanina amônia-liase, também será utilizado para a análise de peroxidases. A avaliação da atividade de peroxidases será realizada conforme metodologia de Cortelazzo et al. (1996), pela quantificação através da medida da absorbância a 470nm da reação de oxidação do guaiacol.

- **b-1,3-glucanases**

A atividade de b-1,3-glucanase será medida seguindo metodologia de Resende et al. (2007), utilizando substrato CM-Curdlan-RBB (4mg.mL⁻¹) e com o ajuste da alíquota do extrato enzimático para 100µL. A reação será incubada durante 100 min. a 35° C. Uma alíquota de 210µL do sobrenadante de cada amostra será transferida para uma nova microplaca para leitura a 620nm, em espectrofotômetro.

- **Quitinases**

A atividade de quitinase será determinada pela adição de 70µL do extrato enzimático ajustado para 310 µL da solução contendo acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e 60 µL de CM-Chitin-RBV (2 mg.mL⁻¹), em microplacas de 96 cavidades (com volume de 350 µL). Após a incubação a 35 °C por 80min, as

amostras serão acidificadas com 50µL de HCl 0,5 N, resfriadas em banho de gelo por 10 min e centrifugadas (1450 x *g* por 10min). Uma alíquota de 210µL do sobrenadante de cada amostra será então transferida para uma nova microplaca, sendo a leitura realizada a 492nm em leitor de microplacas (RESENDE et al., 2007).

4.2. Metas

Subprojeto 1: caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético de *Opuntia* spp visando a sua utilização como forrageira e prospectando novas potencialidades a partir da coleção do insa

Meta 1 – Caracterização de 142 acessos de *Opuntia* spp. do banco de germoplasma do INSA, com base em características morfoagronômicas e bromatológicas e disponibilizá-los ao programa de melhoramento genético;

Meta 2 – Avaliação da diversidade genética entre e dentro de espécies de *Opuntias* do banco de germoplasma do INSA, com base em marcador molecular e indicar pelos menos 10 potenciais genitores para o programa de hibridação;

Meta 3 – Determinação do nível de ploidia de 142 acessos do banco de germoplasma por meio de citometria de fluxo e/ou contagem do número de cromossomos;

Meta 4 – Caracterização bioquímica dos perfis enzimáticos e compostos de interesse em cladódios, frutas e sementes de 142 acessos de palma forrageira, visando uma possível utilização futura na indústria;

Meta 5 – Selecionar de 10 matrizes de palma forrageira mais produtivas e resistentes a Cochonilha-do-carmim e de escama e promover sua autofecundação;

Meta 6 – Selecionar 10 matrizes promissoras de palma forrageira que sejam resistentes a doenças e que produzam frutos com boa qualidade físico-química (coloração mais avermelhada) e promover sua autofecundação para produção de linhagens S₁;

Meta 7 – Avaliar 400 linhagens S1 quanto as características de interesse e selecionar as mais produtivas e resistentes as principais pragas e doenças;

Meta 8 – Desenvolver 20 clones inter- e intraespecíficos mais produtivos de palma forrageira para ampliar a base genética do programa de melhoramento da cultura;

Meta 9 – Induzir 20 linhagens haploides por meios biotecnológicos usando cultura de microsporo (androgenese) e óvulos não-fertilizados (ginogenese);

Meta 10 – Produzir 20 linhagens poliploides a partir de plantas diplóides por meios biotecnológicos (cultivo *in vitro*) usando agentes anti-mitóticos (colchicina, orizalina e trifluralina);

Meta 11 – Reduzir o tempo de juvenildade pelo menos 20% das plântulas derivadas de cruzamentos inter- e intraespecíficos por meio de enxertia;

Meta 12 – Avaliar todos os clones e progênes S1 selecionados em diferentes condições ambientais e no Estado da Paraíba;

Meta 13 – Realizar ações de desenvolvimento de produtos e mercado (dia de campo) da palma como forrageira, destacando também, se for o caso, outras finalidades e usos, como frutífera, salada, medicinal e ornamental

Meta 14 – Formação de recursos humanos em fitomelhoramento (01 Mestrando e 01 Doutorando - Programa de Pós-graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba).

Subprojeto 2: estratégia de manejo para controle da cochonilha-de-escama em palma forrageira

Meta 1 – Determinação do nível de infestação da Cochonilha-de-escama em quatro variedades de palma forrageira em três propriedades no Estado da Paraíba e três propriedades no Rio Grande do Norte

Etapa 1 – Seleção dos municípios (três em cada estado) e propriedades onde haja plantios de idade mais ou menos semelhantes para os materiais de palma a serem avaliados

Etapa 2 – Fazer a avaliação da infestação nas propriedades selecionadas no mesmo período de tempo

Etapa 3 – Relacionar o nível de infestação com o material vegetal avaliado, propriedade, microrregião e estado

Meta 2 – Biologia de *Diaspis echinocacti* criada em diferentes variedades de palma forrageira

Etapa 1 – Criação de manutenção de *D. echinocacti* em cultivos de diferentes variedades de palma forrageira em casa de vegetação

Etapa 2 – Determinação dos parâmetros biológicos de *D. echinocacti* em diferentes variedades de palma forrageira em condições controladas de laboratório e casa de vegetação

Meta 3 – Seleção de pelo menos um material, oriundo do banco de germoplasma do INSA, resistente à cochonilha através de testes em laboratório e semi campo

Etapa 1 – Avaliação da infestação em todos os materiais sem chance de escolha em condições controladas

Etapa 2 – Avaliação da infestação nos materiais através da migração natural das ninfas com múltipla chance de escolha.

Meta 4 – Avaliação da eficiência de óleos vegetais no campo em quatro variedades cultivadas nos dois estados e teste de seletividade desses óleos a inimigos naturais em laboratório

Etapa 1 – seleção de três óleos vegetais e quatro concentrações para os testes de eficiência no controle a cochonilha no campo

Etapa 2 – aplicação do(s) óleo(s) que se mostraram mais eficientes em condição de campo sobre uma espécie de inimigo natural a ser determinado em função das avaliações de campo

Meta 5 – Desenvolvimento de uma técnica de criação da joaninha, *Coccidophilus citricola*, em condições controladas de laboratório.

- Etapa 1 – Criação da joaninha em colônias de Cochonilhas-de-escama, *D. echinocacti*
- Etapa 2 – Criação da joaninha em ovos de *A. kuehniella*
- Etapa 3 – Avaliação da eficiência da joaninha sobre a Cochonilha-de-escama, *D. echinocacti*

Meta 6 – Uso do consórcio da palma com sorgo forrageiro

- Etapa 1 – Plantio intercalado de sorgo forrageiro, formando bordaduras de contorno nas áreas de palma forrageira
- Etapa 2 – Avaliação da infestação da cochonilha nos materiais com e sem a presença de sorgo forrageiro

Meta 7 – Uso de indutor de resistência na palma forrageira

- Etapa 1 – Aplicação de micronutriente via foliar a base de silício e potássio
- Etapa 2 – Avaliação da infestação das plantas após tratamento

Subprojeto 3: manejo integrado de doenças em palma forrageira no semiárido

Meta 1 – Identificar todos os organismos fitopatogênicos associados à cultura da palma nas propriedades amostradas e confirmar sua patogenicidade.

- Etapa 1 – Obtenção de amostras de palma forrageira contendo sintomas de doenças em propriedades rurais do semiárido.
- Etapa 2 – Realização de análise sanitária (Blotter-test) nas amostras.
- Etapa 3 – Identificação dos fitopatógenos associados à cultura da palma.
- Etapa 4 – Determinação do índice de crescimento micelial, germinação de esporos e patogenicidade.

Meta 2 – Realizar em três anos, estudo epidemiológico para as principais doenças encontradas em associação com a palma forrageira.

- Etapa 1 – Determinação em laboratório, do grau de severidade das doenças.
- Etapa 2 – Determinação a campo da intensidade das doenças.
- Etapa 3 – Instalação de unidades experimentais em propriedades rurais.

Meta 3 – Identificar ao menos dois extratos vegetais eficientes no controle de fungos fitopatogênicos da palma forrageira.

- Etapa 1 – Condução de experimento para verificar a eficiência do controle com extratos vegetais.

Meta 4 - Determinar pelo menos um antagonista capaz de controlar patógenos em palma forrageira.

- Etapa 1 – Condução de experimento de controle biológico de patógenos em palma forrageira.

Meta 5 – Identificar ao menos um genótipo de palma forrageira com resistência a nematoides.

- Etapa 1 – Multiplicação, em casa de vegetação, o principal nematoide fitopatogênico encontrado.
- Etapa 2 – Condução de experimento de resistência genética de genótipos de palma a nematoides.

Meta 6 - Transferir conhecimentos através da publicação de ao menos dois artigos científicos, um manual de identificação dos principais agentes etiológicos de doenças em palma forrageira e um relatório a cada ano do projeto.

- Etapa 1 – Confecção de artigos científicos.
- Etapa 2 – Confecção de manuais de identificação.
- Etapa 3 – Confecção de relatórios.

4.3. **Avaliação**

Objetivos específicos	Indicadores	Meios de verificação
Caracterizar acessos de <i>Opuntia</i> spp. do banco de germoplasma do INSA, com base em características morfoagronômicas e bromotalógicas	142 acessos caracterizados	Planilha de dados elaborada com os dados obtidos
Avaliar a diversidade genética entre e dentro de espécies de Opuntias do banco de germoplasma do INSA, com base em marcador molecular	Indicação de 10 genitores	Dendrograma com os 10 indivíduos identificados

Determinar o nível de ploidia de acessos do banco de germoplasma por meio de citometria de fluxo e/ou contagem do número de cromossomos	Nível de ploidia de 142 acessos	Gráficos de citometria de fluxo e/ou tabela de dados com a contagem cromossômica e nível de ploidia dos acessos
Caracterizar bioquimicamente os perfis enzimáticos e compostos de interesse em cladódios, frutas e sementes de acessos de palma forrageira, visando sua utilização na indústria	142 acessos caracterizados bioquimicamente	Planilha com perfis bioquímicos dos compostos analisados encontrados nos acessos
Selecionar matrizes de palma forrageira mais produtivas e resistentes a Cochonilha-do-carmim e de escama e promover sua autofecundação	Indicação de 10 matrizes - 10 genótipos autofecundados	Registro fotográfico de frutos coletados nas plantas que foram autofecundadas; fotos de plântulas germinadas a partir das sementes desses frutos
Selecionar matrizes promissoras de palma forrageira que sejam resistentes a doenças e que produzam frutos com boa qualidade físico-química (coloração mais avermelhada) e promover sua autofecundação para produção de linhagens S ₁	Seleção de 10 matrizes	Registro fotográfico de frutos coletados nas plantas que foram autofecundadas; fotos de plântulas germinadas a partir das sementes desses frutos
Avaliar linhagens S ₁ e selecionar as mais produtivas e resistentes as principais pragas e doenças	Obtenção de 400 linhagens S ₁	Planilha de avaliação com dados coletados
Desenvolver clones inter- e intraespecíficos mais produtivos de palma forrageira para ampliar sua base genética	Cruzamentos entre 10 clones	Registro fotográfico de frutos nas plantas que foram intercruzadas; fotos de plântulas germinadas a partir das sementes desses frutos
Induzir linhagens haploides por meios cultura de microsporo e óvulos não-fertilizados	Obtenção de 10 linhagens haplóides	Planilha contendo informações dos números de cromossomos das linhagens regeneradas <i>in vitro</i>
Produzir linhagens poliploides a partir de plantas dipóides por meios cultivo <i>in vitro</i> usando agentes anti-mitóticos (colchicina, orizalina e trifluralina)	Obtenção de 10 linhagens poliplóides	Planilha contendo informações dos números de cromossomos das linhagens regeneradas <i>in vitro</i>
Reduzir o tempo de juvenilidade das plântulas derivadas de cruzamentos inter- e intraespecíficos por meio de enxertia	Clones enxertados com sucesso	Planilha com informações sobre o período juvenil dos clones enxertados
Avaliar clones e progenies S ₁ selecionados em diferentes condições ambientais e no Estado da Paraíba	Ensaios de competição no campo com todos os clones e Progenies S ₁	Planilha com os dados coletados; gráficos com os resultados da análise
Realizar ações de desenvolvimento de produtos e mercado (dia de campo) sobre a palma forrageira, destacando, se houver resultados promissores, outras finalidades de uso, como frutífera, salada, medicinal e ornamental	Realização de dia de campo	Dias de campo realizados
Formação de recursos humanos em fitomelhoramento	Acompanhamento dos alunos e sua participação no projeto	Uma dissertação e uma tese desenvolvidas
Avaliar o nível de infestação da cochonilha em nível de campo nos materiais ou “genótipos” em diferentes níveis sucessionais na Paraíba e Rio Grande do Norte	Diferenciação dos diferentes níveis de infestação da cochonilha em campo	Registros fotográficos e planilhas gráficas
Relacionar a infestação com a “qualidade” do material vegetal	Coleta de raquetes para análise qualitativa	Avaliação estatística para comparação dos materiais, com planilhas dos resultados
Aplicar como tratamento de controle após avaliação da infestação inicial, óleos vegetais e indutores de resistência	Coleta de dados da infestação dos materiais tratados	Registros fotográficos, planilhas gráficas e análises comparativas
Avaliar os aspectos biológicos da cochonilha em diferentes “variedades”	Análises de parâmetros biológicos quantitativos da cochonilha nos diferentes materiais	Planilhas e avaliação estatística comparativa
Relacionar os inimigos naturais (predadores e parasitoides) presentes nas áreas de avaliação	Análise do número de espécies e densidade de inimigos naturais	Lista em planilhas por ordem de frequência das espécies dos inimigos naturais encontrados nas variedades e regiões
Realizar testes de seletividade e toxicidade de óleos vegetais;	Análise da porcentagem de fitotoxicidade e seletividade dos óleos vegetais	Planilhas e avaliação estatística comparativa
Realizar testes de resistência com e sem chance de escolha em laboratório	Coleta de materiais sadios, infestação e análise	Planilhas, registro fotográfico e avaliação estatística comparativa

Selecionar genótipos resistentes e suscetíveis à Cochonilha-de-escama	Avaliação e análise das raquetes infestadas e sadias	Planilhas e avaliação estatística comparativa
Conhecer os tipos de resistência envolvidos	Coleta de raquetes para análise em laboratório	Avaliação estatística comparativa entre os materiais
Comprovar a resistência em condições de campo, avaliando os parâmetros relacionados aos insetos e às plantas	Análise do índice de infestação em campo	Avaliação estatística comparativa entre os materiais, com planilhas dos resultados
Avaliar a possibilidade do uso de controle biológico da Cochonilha-de-escama da palma forrageira	Análise do índice populacional dos insetos benéficos	Planilhas e avaliação estatística comparativa
Deteção <i>in locu</i> das plantas com sintomatologia típica de fitopatógenos	Monitoramento das áreas selecionadas e cultivares plantadas em cada área	Registro fotográfico, planilha dos dados em meio eletrônico e questionário com os produtores de cada área
Isolamento e identificação dos microrganismos fitopatogênicos	Observação em microscopia óptica e estereoscópica e consulta em literatura especializada	Microscopia, troca de informações entre os pares e registro fotográfico através do microscópio
Determinação do percentual de incidência de doenças na cultura da palma	Contagem numérica da ocorrência da doença na área avaliada e separação em % a partir dos sintomas observados	Monitoramento da área com registro fotográfico e anotações da evolução da doença no campo
Cultivo e manutenção dos isolados para ensaios <i>in vitro</i> do crescimento micelial, germinação de esporos e testes de patogenicidade	Incubar os fitopatógenos em condições de conservação. Identificar os agentes causais com código na Micoteca da UFPB para estudos posteriores	Visualização em microscopia com registro fotográfico das colônias <i>in vitro</i>
<p>Estudo epidemiológico:</p> <ul style="list-style-type: none"> Avaliação periódica (mensal) da intensidade das doenças, determinada através da incidência e severidade. Determinação do grau de severidade de cada doença diagnosticada, da patogenicidade de cada microrganismo identificado e da longevidade em condições de campo. Descrição da sintomatologia, formas de disseminação e infecção, formas de resistência do hospedeiro e do patógeno. Correlacionar o progresso da doença, no espaço e no tempo, visando determinar os fatores climáticos que podem estar influenciando na maior ou menor incidência de cada doença em cada localidade e ao longo do tempo. Estabelecer a associação entre intensidade da doença de acordo com o genótipo estudado. 	<ul style="list-style-type: none"> Identificar os principais genótipos infectados e correlacionar de acordo com a genética e condições ambientais. Relacionar as doenças aos sintomas expressos, de acordo com a intensidade. Reconhecimento da evolução dos principais danos ao longo do tempo. 	<ul style="list-style-type: none"> Planilha de índice de severidade da doença x tempo. Questionário sobre evolução da doença em campo (fechado).
Verificar o efeito de produtos alternativos no controle <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de fitopatógenos isolados de cultivares de palma forrageira	Testar em condições de laboratório a possível eficiência dos produtos que serão aplicados em campo	Anotações dos resultados em planilhas específicas, registro fotográfico através de comparações da velocidade de crescimento de cada gênero
Verificar a eficiência do controle biológico sobre patógenos incidentes em cultivares de palma forrageira	Testar em condições de laboratório a possível eficiência dos produtos que serão aplicados em campo	Anotações dos resultados em planilhas específicas, registro fotográfico através de comparações da velocidade de crescimento de cada gênero
Verificar a indução de resistência de cultivares de palma forrageira a patógenos incidentes	Testar a eficiência dos tratamentos alternativos sobre a manifestação das reações das plantas. Análise enzimática para comprovar a indução de resistência	Planilhas e resultados estatísticos demonstrando a eficiência dos tratamentos e fotos dos sintomas diferenciados individualmente entre os tratamentos aplicados
Contribuir para o desenvolvimento regional, com informações acerca dos principais agentes etiológicos de doenças em palma forrageira e alternativas de manejo	Elaboração de cartilhas instrutivas, contendo o quadro sintomatológico das principais doenças observadas; Definição de estratégias de manejo das principais doenças em palma forrageira	1 Cartilha elaborada

5. JUSTIFICATIVA E MOTIVAÇÃO PARA CELEBRAÇÃO DO TED

No Nordeste do Brasil a palma forrageira é a principal cultura perene utilizada para alimentação animal, sendo indispensável para a pecuária no Semiárido em decorrência de vários atributos: (1) realiza a fotossíntese por meio do metabolismo ácido das crassuláceas, abrindo os estômatos à noite e fechando durante o dia, minimizando a perda de água; (2) representa importante reserva de água de ótima qualidade para época seca do ano; (3) planta perene; (4) possui alta eficiência no uso da água; (5) elevada palatabilidade e valor nutritivo; (6) manutenção das qualidades forrageiras à medida que a planta envelhece.

Apesar desta enorme importância, há aproximadamente 20 anos os palmais vêm sendo dizimados pela cochonilha-do-carmim. Isto ocorre principalmente por se cultivar predominantemente uma única espécie, *Opuntia ficus-indica*, conhecida popularmente como variedades ‘Gigante e Redonda’. Estima-se que foram perdidos aproximadamente 200.000 ha de palma, sendo seu controle mais eficiente através do uso de variedades resistentes. No entanto, ainda existem pouquíssimos materiais genéticos resistentes a este inseto, sendo os principais: duas variedades de *Nopalea cochenillifera* (Miúda e IPA Sertânia), além da palma Orelha de elefante Africana (*Opuntia undulata* Griffiths) e Orelha de elefante Mexicana (*Opuntia strica* Haw). Esta quantidade de materiais é extremamente pequena e põe em risco a estabilidade forrageira do produtor rural, uma vez que novas pragas podem aparecer.

Antes do surto da Cochonilha-do-carmim, a Cochonilha-de-escama (*Diaspis echinocacti* Bouché) era considerada a praga mais séria da palma no Semiárido do Nordeste, principalmente nos locais menos favoráveis ao seu cultivo, por terem as noites quentes. Apesar de não haver evidências de perdas de palmais por danos ocasionados pela cochonilha-de-escama, há grande preocupação, pois ainda não se tem disponível nenhum material resistente a ambas as pragas (cochonilha-do-carmim e cochonilha-de-escama), tornando fundamental o desenvolvimento de estudos sobre o ciclo biológico dessa praga nos genótipos de palma cultivados no Nordeste. Além das pragas que acometem a palma forrageira, problemas fitossanitários vêm surgindo cada vez mais, principalmente com o aparecimento de doenças fúngicas e bacterianas, evidenciando uma outra preocupação, uma vez que são escassos estudos com doenças na palma forrageira.

Mesmo a palma forrageira (*Opuntia* ou *Nopalea* spp.) sendo a principal planta xerófila cultivada no Brasil, base alimentar dos rebanhos, especialmente na época de estiagem, estudos que visem ao desenvolvimento de novas cultivares/variedades, assim como a resolução de alguns problemas fitossanitários, ainda são escassos. Diante disto, é fundamental realizar pesquisas que visem ao desenvolvimento de tecnologias que irão fortalecer o cultivo da palma forrageira na região semiárida, garantindo a sustentabilidade ambiental e o desenvolvimento econômico da região. Para isso, serão realizados três subprojetos que contribuirão de forma conjunta para que os produtores de palma tenham tecnologias diversas para produzir sem risco de os palmais serem acometidos por pragas e doenças, quais sejam:

- **Subprojeto 1:** Caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético de *Opuntia* spp visando a sua utilização como forrageira e prospectando novas potencialidades a partir da coleção do INSA.
- **Subprojeto 2:** Estratégia de manejo para controle da cochonilha-de-escama em palma forrageira.
- **Subprojeto 3:** Manejo integrado de doenças em palma forrageira no semiárido.

6. SUBDESCENTRALIZAÇÃO

A Unidade Descentralizadora autoriza a subdescentralização para outro órgão ou entidade da administração pública federal?

- (x) Sim
- () Não

7. FORMAS POSSÍVEIS DE EXECUÇÃO DOS CRÉDITOS ORÇAMENTÁRIOS:

A forma de execução dos créditos orçamentários descentralizados poderá ser:

- (x) Direta, por meio da utilização capacidade organizacional da Unidade Descentralizada.
- (x) Contratação de particulares, observadas as normas para contratos da administração pública.
- (x) Descentralizada, por meio da celebração de convênios, acordos, ajustes ou outros instrumentos congêneres, com entes federativos, entidades privadas sem fins lucrativos, organismos internacionais ou fundações de apoio regidas pela Lei nº 8.958, de 20 de dezembro de 1994.

8. CUSTOS INDIRETOS (ART. 8, §2º)

A Unidade Descentralizadora autoriza a realização de despesas com custos operacionais necessários à consecução do objeto do TED?

- (x) Sim
- () Não

O pagamento será destinado aos seguintes custos indiretos, até o limite de 20% do valor global pactuado:

1. Despesas Operacionais e Administrativas - R\$ 47.984,90

9. CRONOGRAMA FÍSICO-FINANCEIRO

Subprojeto 1: Caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético de *Opuntia* spp visando a sua utilização como forrageira e prospectando novas potencialidades a partir da coleção do INSA.

Metas	Descrição	Unid. de Medida	Quant.	Valor Unit.	Valor Total	Início	Fim
Meta 1	Caracterização de 142 acessos de <i>Opuntia</i> spp. do banco de germoplasma do INSA, com base em características morfoagronômicas e bromatológicas e disponibilizá-los ao programas de melhoramento genético.	Unid.	142	95,75	13.600,00	Mês 01	Mês 10
Produto	142 acessos de <i>Opuntia</i> spp. caracterizados						
Meta 2	Avaliação da diversidade genética entre e dentro de espécies de <i>Opuntias</i> do banco de germoplasma do INSA, com base em marcador molecular e indicar pelos menos 10 potenciais genitores para o programa de hibridação.	Unid.	10	850	8.500,00	Mês 01	Mês 21
Produto	10 genitores identificados para usar em programa de hibridação						

Meta 3	Determinação do nível de ploidia de 142 acessos do banco de germoplasma por meio de citometria de fluxo e/ou contagem do número de cromossomos.	Unid.	142	105,65	15.000,00	Mês 01	Mês 15
Produto	142 acessos caracterizados quanto ao nível de ploidia						
Meta 4	Caracterização bioquímica dos perfis enzimáticos e compostos de interesse em cladódios, frutas e sementes de 142 acessos de palma forrageira, visando sua utilização na indústria.	Unid.	142	200,00	28.400,00	Mês 01	Mês 15
Produto	142 acessos caracterizados bioquimicamente para seleção dos que apresentam potencial de uso na indústria						
Meta 5	Selecionar de 10 matrizes de palma forrageira mais produtivas e resistentes a Cochonilha-do-carmim e de escama e promover sua autofecundação.	Unid.	10	1.500,00	15.000,00	Mês 13	Mês 21
Produto	10 matrizes selecionadas para a realização de autofecundação						
Meta 6	Selecionar 10 matrizes promissoras de palma forrageira voltada para a qualidade físico-química de fruto (coloração mais avermelhada) e que sejam resistentes a doenças e promover sua autofecundação para produção de linhagens S1.	Unid.	10	1.000,00	10.000,00	Mês 03	Mês 21
Produto	Linhagens S1 produzidas						
Meta 7	Avaliar 400 linhagens S1 quanto e selecionar as mais produtivas e resistentes as principais pragas e doenças.	Unid.	400	62,50	25.000,00	Mês 11	Mês 36
Produto	Seleção de linhagens dentro de S1 produtivas e resistentes a pragas e doenças						
Meta 8	Desenvolver 20 clones inter- e intraespecíficos mais produtivos de palma forrageira para ampliar a base genética do programa de melhoramento da cultura.	Unid.	20	1.750,00	35.000,00	Mês 21	Mês 36
Produto	20 clones clones inter- e intraespecíficos desenvolvidos						
Meta 9	Induzir 20 linhagens haplóides por meios biotecnológicos usando cultura de micrósporo (androgenese) e óvulos não-fertilizados (ginogenese).	Unid.	20	500,00	10.000,00	Mês 04	Mês 22
Produto	20 linhagens haploides induzidas						
Meta 10	Produzir 20 linhagens poliploides a partir de plantas diplóides por meios biotecnológicos (cultivo in vitro) usando agentes anti-mitóticos (colchicina, orizalina e trifluralina).	Unid.	20	650,00	13.000,00	Mês 04	Mês 22
Produto	20 linhagens poliploides produzidas						
Meta 11	Reduzir o tempo de juvenildade pelo menos 20% das plântulas derivadas de cruzamentos inter- e intraespecíficos por meio de enxertia.	%.	20	330,59	6.611,83	Mês 07	Mês 13
Produto	Pelo menos 20% de plantas apresentando tempo reduzido de juvenildade						
Meta 12	Avaliar todos os clones e progênies S1 selecionados em diferentes condições ambientais e no Estado da Paraíba.	Unid.	20	380,00	7.600,00	Mês 06	Mês 36
Produto	Campos instalados com clones e progenies S1 em diferentes condições ambientais no Estado da Paraíba						
Meta 13	Realizar pelo menos 03 ações de desenvolvimento de produtos e mercado (dia de campo) da palma forrageira com diversas finalidades: forragem, frutífera, salada, medicinal e ornamental.	Unid.	3	2.000,00	6.000,00	Mês 12	Mês 36
Produto	Dias de campo realizado						
Meta 14	Formação de recursos humanos em fitomelhoramento, 01 Mestrando e 01 Doutorando, do Programa de Pós-graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba.	Unid.	2	Não se aplica	Não se aplica	Mês 01	Mês 36
Produto	Uma Tese e uma Dissertação realizada e artigos publicados para o subprojeto como um todo						

Subprojeto 2: Estratégia de manejo para controle da cochonilha-de-escama em palma forrageira.

Metas / Etapas	Descrição	Unid. de Medida	Quant.	Valor Unit.	Valor Total	Início	Fim
Meta 1	Determinação do nível de infestação da Cochonilha-de-escama						
1	Seleção dos municípios e propriedades	Unid.	6	Não se aplica	Não se aplica	Mês 1	Mês 2
2	Avaliação da infestação	Planta	2400	3,125	7.500,00	Mês 1	Mês 32
3	Comparação dos índices de infestação	Planta	2400	3,125	7.500,00	Mês 1	Mês 31
Produto	Nível de infestação da Cochonilha-de-escama determinado nos municípios e propriedades selecionadas para o estudo						
Meta 2	Biologia de <i>Diaspis echinocacti</i> criada em diferentes variedades de palma forrageira						
1	Criação de manutenção	Unid.	4	6.250,00	25.000,00	Mês 5	Mês 31
2	Determinação dos parâmetros biológicos	Unid.	8	Não se aplica	Não se aplica	Mês 7	Mês 31
Produto	Parâmetros biológicos determinados						
Meta 3	Seleção de pelo menos um material resistente à Cochonilha-de-escama						
1	Avaliação da infestação induzida em todos os materiais sem chance de escolha;	Planta	144	248,96	35.850,24	Mês 9	Mês 27
2	Avaliação da infestação nos materiais através da migração natural das ninfas com mesma chance de escolha	Amostras	432	Não se aplica	Não se aplica	Mês 15	Mês 25
Produto	Material selecionado com resistência a Cochonilha-de-escama						
Meta 4	Avaliação da eficiência de óleos vegetais sobre a Cochonilha-de-escama e seletividade à joaninha						
1	Seleção de três óleos vegetais e quatro concentrações para os testes de eficiência no controle a cochonilha no campo	Unid.	12	625,00	7.500,00	Mês 9	Mês 26
2	Aplicação do(s) óleos e dosagem que se mostraram mais eficientes em condição de campo sobre e um inimigo natural a ser determinado em função das avaliações de campo;	Unid.	3	2.500,00	7.500,00	Mês 20	Mês 30
Produto	Óleo vegetais selecionados						
Meta 5	Técnica para criação da joaninha para controle biológico da Cochonilha-de-escama						
1	Criação da joaninha em Cochonilha-de-escama	Unid.	200	125,00	25.000,00	Mês 19	Mês 29
2	Criação da joaninha em ovos de presa alternativa	Unid.	200	Não se aplica	Não se aplica	Mês 19	Mês 32
3	Avaliação da eficiência da joaninha sobre a Cochonilha-de-escama	Unid.	200	Não se aplica	Não se aplica	Mês 19	Mês 33
Produto	Técnica desenvolvida						

Meta 6	Uso do consórcio da palma com sorgo forrageiro						
1	Plantio intercalado de sorgo forrageiro, formando bordaduras de contorno nas áreas de palma forrageira	Unid.	2	13.500,00	27.000,00	Mês 3	Mês 10
2	Avaliação da infestação da cochonilha nos materiais com e sem a presença de sorgo forrageiro	Unid.	2	Não se aplica	Não se aplica	Mês 8	Mês 28
Produto	Campos implantados						
Meta 7	Uso de indutor de resistência na palma forrageira						
1	Aplicação de micronutriente via foliar a base de silício e potássio	Unid.	6	4.166,67	25.000,02	Mês 10	Mês 27
2	Avaliação da infestação das plantas após tratamento	Unid.	40	Não se aplica	Não se aplica	Mês 10	Mês 29
3	Publicações	Unid.	6	Não se aplica	Não se aplica	Mês 6	Mês 36
4	Relatórios anuais	Unid.	3	Não se aplica	Não se aplica	Mês 12	Mês 36
Produto	Indutor de resistência aplicado e artigos publicados para o subprojeto como um todo						

Subprojeto 3: Manejo integrado de doenças em palma forrageira no semiárido.

Metas / Etapas	Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unit.	Valor Total	Início	Fim
Meta 1	Identificar todos os organismos fitopatogênicos associados à cultura da palma nas propriedades amostradas e confirmar sua patogenicidade						
1	Obtenção de amostras de palma forrageira contendo sintomas de doenças em propriedades rurais do semiárido.	Amostra	100	151,50	15.150,00	Mês 1	Mês 7
2	Realização de análise sanitária (Blotter-test) nas amostras.	Unid.	100	Não se aplica	Não se aplica	Mês 1	Mês 7
3	Identificação dos fitopatógenos associados à cultura da palma.	Placa	150	42,00	6.300,00	Mês 3	Mês 10
4	Determinação do índice de crescimento micelial, germinação de esporos e patogenicidade.	Unid.	10	970,34	9.703,40	Mês 6	Mês 13
Produto	Organismos fitopatogênicos identificados e caracterizados						
Meta 2	Realizar em três anos, estudo epidemiológico para as principais doenças encontradas em associação com a palma forrageira						
1	Determinação em laboratório, do grau de severidade das doenças.	Análise	10	644,00	6.440,00	Mês 8	Mês 16
2	Determinação a campo da intensidade das doenças.	Avaliação	60	100,00	6.000,00	Mês 8	Mês 18
3	Instalação de unidades experimentais em propriedades rurais.	Unid.	3	9.600,00	28.800,00	Mês 14	Mês 26
Produto	Unidades experimentais instaladas e nível de severidade das doenças determinados						
Meta 3	Identificar, ao menos, dois extratos vegetais eficientes no controle de fungos fitopatogênicos da palma forrageira						

1	Condução de experimento para verificar a eficiência do controle com extratos vegetais.	Placa	100	219,46	21.946,00	Mês 24	Mês 30
Produto	Óleos vegetais com efeito fungicida identificados						
Meta 4 Determinar pelo menos um antagonista capaz de controlar patógenos em palma forrageira							
1	Condução de experimento de controle biológico de patógenos em palma forrageira.	Placa	80	116,67	9.333,60	Mês 25	Mês 31
Produto	Experimento instalado e antagonista identificado						
Meta 5 Identificar ao menos um genótipo de palma forrageira com resistência a nematoides							
1	Multiplicação, em casa de vegetação, do principal nematoide fitopatogênico encontrado.	Planta	100	73,07	7.307,00	Mês 25	Mês 29
2	Condução de experimento de resistência genética de genótipos de palma a nematoides.	Planta	100	73,07	7.307,00	Mês 29	Mês 34
Produto	Genótipo de palma identificado com resistência a nematóide						
Meta 6 Transferir conhecimentos através da publicação de ao menos dois artigos científicos, um manual de identificação dos principais agentes etiológicos de doenças em palma forrageira e um relatório a cada ano do projeto							
1	Confecção de artigos científicos.	Unid.	3	Não se aplica	Não se aplica	Mês 8	Mês 36
2	Confecção de manuais de identificação.	Unid.	1	Não se aplica	Não se aplica	Mês 18	Mês 20
3	Confecção de relatórios anuais.	Unid.	3	Não se aplica	Não se aplica	Mês 12	Mês 36
Produto	Artigos e manuais publicados para o subprojeto como um todo						

10. CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO

Mês/Ano	Valor
09/2020	211.365,09
02/2021	139.342,00
02/2022	129.142,00
TOTAL	479.849,09

11. PLANO DE APLICAÇÃO CONSOLIDADO – PAD

a) Parcela 1 -2020

Programa	Ação	Natureza da Despesa		2020 Valor (R\$ 1,00)	%
		Código	Descrição		
Programa 2217 – Desenvolvimento Regional, Territorial e Urbano	Ação 8340 - Desenvolvimento da Rede Regional de Inovação	339014	Diárias - Pessoal Civil	8.053,50	3,81
		339030	Material de Consumo	131.698,46	62,30
		449052	Equipamentos e Material Permanente	25.231,62	11,94
		339020	Auxílio Financeiro a Pesquisadores	21.200,00	10,03
		339033	Passagens e	-----	-----

			Despesas com Locomoção		---
		339036	Outros Serviços de Terceiros Pessoa - Física	4.045,00	1,91
		339039	Outros Serviços de Terceiros Pessoa Jurídica	21.136,51	10,10
		TOTAL		211.365,09	100,00

b) Parcela 2 -2021

Programa	Ação	Natureza da Despesa		2021 Valor (R\$ 1,00)	%
		Código	Descrição		
Programa 2217 – Desenvolvimento Regional, Territorial e Urbano	Ação 8340 - Desenvolvimento da Rede Regional de Inovação	339014	Diárias - Pessoal Civil	18.585,00	13,34
		339030	Material de Consumo	22.496,00	16,14
		449052	Equipamentos e Material Permanente	13.178,53	9,46
		339020	Auxílio Financeiro a Pesquisadores	58.300,00	41,84
		339033	Passagens e Despesas com Locomoção	2.300,00	1,65
		339036	Outros Serviços de Terceiros Pessoa Física	5.258,50	3,77
		339039	Outros Serviços de Terceiros Pessoa Jurídica	19.223,97	13,80
		TOTAL		139.342,00	100,00

c) Parcela 3 -2022

Programa	Ação	Natureza da Despesa		2022 Valor (R\$1,00)	%
		Código	Descrição		
Programa 2217 – Desenvolvimento Regional, Territorial e Urbano	Ação 8340 - Desenvolvimento da Rede Regional de Inovação	339014	Diárias - Pessoal Civil	17.965,50	13,91
		339030	Material de Consumo	18.593,58	14,40
		449052	Equipamentos e Material Permanente	-----	
		339020	Auxílio Financeiro a Pesquisadores	74.700,00	57,84
		339033	Passagens e Despesas com Locomoção	-----	
		339036	Outros Serviços de Terceiros Pessoa Física	5.258,50	4,07
		339039	Outros Serviços de Terceiros Pessoa Jurídica	12.624,42	9,78
		TOTAL		129.142,00	100,00

d) Consolidado três parcelas

Código da Natureza da Despesa	Custo Indireto	Valor Previsto
33.90.14	Não	44.604,00
33.90.30	Não	172.788,04
44.90.52	Não	38.410,15
33.90.20	Não	154.200,00
33.90.33	Não	2.300,00
33.90.36	Sim	14.562,00
33.90.39	Sim	52.984,90
TOTAL	-	479.849,09

12. PROPOSIÇÃO

JUCILENE SILVA ARAÚJO
Responsável Técnica do INSA

MÔNICA TEJO CAVALCANTI
Diretora do INSA

13. APROVAÇÃO

MARCELO SAIKI BRAGA

Engenheiro Agrônomo

ROBSON JOSÉ ALVES BRANDÃO

Coordenador-Geral da CGEP

IVALDO CAVALCANTI DA CRUZ NETO

Superintendente da SUDENE



Documento assinado eletronicamente por **Mônica Tejo Cavalcanti, Usuário Externo**, em 29/09/2020, às 12:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jucilene Silva Araújo, Usuário Externo**, em 29/09/2020, às 13:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Saiki Braga, Engenheiro Agrônomo**, em 29/09/2020, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robson José Alves Brandão, Coordenador-Geral**, em 29/09/2020, às 14:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evaldo Cavalcanti da Cruz Neto, Superintendente**, em 29/09/2020, às 15:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.sudene.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0184860** e o código CRC **4B0F1BA4**.