



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DO COLMO DAS
ESPÉCIES BRASILEIRAS DO GÊNERO *Saccharum* L. (POACEAE)**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Botânica, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

**Aluna: SILVIA DIAS DA COSTA FERNANDES
Orientadora: Prof^a Dr^a DALVA GRACIANO RIBEIRO**

Brasília - DF

Dezembro, 2013



**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA
DO COLMO DAS ESPÉCIES BRASILEIRAS DO
GÊNERO *Saccharum* L. (POACEAE)**

SILVIA DIAS DA COSTA FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA
DO COLMO DAS ESPÉCIES BRASILEIRAS DO
GÊNERO *Saccharum* L. (POACEAE)**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Botânica, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª DALVA GRACIANO RIBEIRO

Brasília - DF

Dezembro, 2013

TERMO DE APROVAÇÃO

SILVIA DIAS DA COSTA FERNANDES

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DO COLMO DAS ESPÉCIES BRASILEIRAS DO GÊNERO *Saccharum* L. (POACEAE)

Tese aprovada como requisito à obtenção do grau de Doutora em Botânica,
Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade de Brasília, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora:


Profª Drª Dalva Graciano Ribeiro
Departamento de Biologia Geral, UFG


Dr. Tarciso de Sousa Filgueiras
Divisão de Fitotaxonomia, IBt


Profª Drª Maria Helena Rezende
Departamento de Biologia Geral, UFG


Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov
Departamento de Biologia Geral, UFG


Profª Drª Cristiane da Silva Ferreira
Departamento de Botânica, UnB


Profª Drª Sarah Christina Caldas Oliveira
Departamento de Botânica, UnB

Brasília/DF, dezembro de 2013

Dedicatória

Aos meus alunos de ontem, de hoje e de amanhã

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai Joel, engenheiro agrônomo, que durante as duas coletas realizadas no Rio Grande do Sul, atuou como motorista, mateiro, patrocinador, incentivador, enfim, pai.

Ao meu esposo Gleyson e minha filha Luiza pelo amor e companheirismo durante nossa vida acadêmica. Os resultados também pertencem a vocês. Obrigada pela paciência.

À minha mãe Adriana por acreditar no meu potencial e pela disposição a ajudar em todos os momentos. Ao meu irmão Mateus pelo eterno otimismo e pelos inúmeros “relaxa”.

Aos amigos e colegas do IFB, obrigada pelo convívio, conversas e palavras de apoio durante a maior parte do doutorado.

Às amizades que começaram na Botânica e que, com certeza serão mantidas apesar da distância. Em especial a Bruno, Fernanda, Izabelly, Jéssika, Juliana, Maria Tereza, Nádia e William.

Agradeço a todos os servidores e professores da UnB e de diversas outras instituições que contribuíram para minha formação profissional e para o desenvolvimento deste trabalho.

Por último, e extremamente importante, agradeço à Prof^a Dr^a Dalva Graciano Ribeiro, minha orientadora desde a graduação. Muito obrigada pela oportunidade, confiança, apoio e amizade nesses quase dez anos de parceria.

Epígrafe

“A melhor maneira de prever o futuro é criá-lo.”

Peter Drucker

RESUMO

Devido à sua posição de destaque na economia global, a cultura da cana-de-açúcar é constantemente estudada em programas de melhoramento, acreditamos que as espécies nativas de *Saccharum* podem servir como diversidade de germoplasma, uma vez que em várias outras culturas é comum a utilização de espécies nativas não cultivadas. No Brasil ocorrem três espécies nativas de *Saccharum* (*S. angustifolium*, *S. asperum* e *S. villosum*), mas as informações sobre elas são escassas e a identificação é baseada nas inflorescências e lâminas foliares, estruturas que nem sempre estão presentes ou portando as características diagnósticas. A anatomia pode ser uma ferramenta para subsidiar a taxonomia das gramíneas, para as espécies supracitadas há poucos estudos anatômicos, e estes não apresentam fins taxonômicos. Este trabalho teve como objetivo descrever a estrutura do colmo, quantificar açúcares solúveis, amido, lignina e silício e analisar a organização das paredes celulares dessas espécies nativas, tendo como parâmetro duas cultivares de cana-de-açúcar (RB 86-7515 e SP 79-1011) para auxiliar a implementação de novas estratégias de melhoramento da cultura da cana-de-açúcar. Dentre as espécies, *S. villosum* é a que apresenta maior distribuição geográfica, sendo que diferentes populações desta espécie podem apresentar alta variabilidade em suas características anatômicas e morfológicas, o que pode dificultar sua identificação. A epiderme foi o tecido que mostrou maior diversidade, populações de *S. villosum* de uma mesma região podem possuir diferentes tipos de tricomas e proporções distintas de esclerênquima, enquanto populações de regiões distantes podem ser bastante semelhantes. *Saccharum asperum* possui células comuns longas maiores, enquanto as células silicificadas, espinhos, microtricomas e macrotricomas são menores e significativamente diferentes das demais espécies. Os maiores microtricomas estão presentes em *S. angustifolium*. É proposta uma nova espécie para o gênero, suas principais diferenças em relação às demais já descritas estão relacionadas a maiores complexos estomáticos, comprimento total e espessura da parede do colmo e comprimento dos 2º e 3º entrenós. *Saccharum villosum* apresenta a maior quantidade de características desejáveis para melhoria da cultura da cana-de-açúcar, como espessura das paredes secundárias das fibras, baixos teores de amido e lignina insolúvel.

Palavras-chave: anatomia, cana-de-açúcar, carboidratos, caule, parede celular.

ABSTRACT

Due to its prominent position in the global economy, sugarcane culture is constantly studied in breeding programs, we believe that *Saccharum* native species can be used as germplasm diversity, as in many others cultures it is common the use of uncultivated natives. In Brazil there are three native species of *Saccharum* (*S. angustifolium*, *S. asperum* and *S. villosum*), but information about them is scarce and identification is based on inflorescence and leaf blades, structures that are not always present or carrying the diagnostic features. The anatomy can be a tool to support the taxonomy of grasses, for the above species there are few anatomical studies, and they didn't have taxonomic purposes. This study aimed to describe the structure of the stem, quantify soluble sugars, starch, lignin and silicon and analyze the organization of the cell walls of these native species, having as parameter two cultivars of sugarcane (RB 86-7515 and SP 79 - 1011) to help to implement new strategies to improve the culture of sugarcane. Among the species, *S. villosum* is the one with the greatest geographic distribution, and different populations of this species may exhibit high variability in their anatomical and morphological characteristics, which can hinder identification. Epidermis is the tissue that showed greater diversity, populations of *S. villosum* from the same region may have different types of trichomes and different proportions of sclerenchyma, while populations in distant areas may be quite similar. *Saccharum asperum* has the largest epidermal long cells while silica cells, prickles, micro and macro-hairs are smaller and significantly different from the other species. The largest micro-hairs are present in *S. angustifolium*. It is proposed a new species for the genus, its main differences from the others already described are related to higher stomatal complexes, total length, culm wall thickness and length of the 2nd and 3rd internodes. *Saccharum villosum* has the highest number of desirable features to improve sugarcane culture such as thickness of the secondary wall of the fiber, little starch and insoluble lignin.

Keywords: anatomy, sugarcane, carbohydrates, stem, cell wall.

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 Aspectos morfológicos das espécies brasileiras de *Saccharum*22

CAPÍTULO 1

Figura 1 Vista frontal da epiderme do colmo de diferentes populações de *S. villosum*44

Figura 2 Epiderme do colmo de diferentes populações de *S. villosum* sob microscopia eletrônica de varredura45

Figura 3 Secções transversais do colmo de diferentes populações de *S. villosum*46

Figura 4 Dendograma gerado a partir da análise de agrupamento das médias padronizadas das variáveis das populações de *S. villosum*47

CAPÍTULO 2

Figura 1 Vista frontal da epiderme do colmo das espécies de *Saccharum*66

Figura 2 Vista frontal da epiderme do colmo de *S. angustifolium* e *S. asperum*67

Figura 3 Epiderme do colmo sob microscopia eletrônica de varredura68

Figura 4 Secções transversais do colmo69

Figura 5 Dendograma gerado a partir da análise de agrupamento das médias padronizadas das variáveis das diferentes espécies de *Saccharum*70

CAPÍTULO 3

Figura 1 Microscopia eletrônica de varredura das espécies de *Saccharum*85

Figura 2 Microscopia eletrônica de transmissão das espécies de *Saccharum*86

CAPÍTULO 4

Figura 1 Microscopia óptica das cultivares SP 79-1011 e RB 86-7515103

Figura 2 Microscopia eletrônica de varredura das cultivares SP 79-1011 e RB 86-7515104

Figura 3 Microscopia eletrônica de transmissão das cultivares SP 79-1011 e RB 86-7515105

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 Dados de coleta das populações de <i>S. villosum</i>	40
Tabela 2 Medidas das estruturas epidérmicas do colmo das populações de <i>S. villosum</i>	41
Tabela 3 Diversidade celular das estruturas epidérmicas em vista frontal do colmo de diferentes populações de <i>S. villosum</i>	42
Tabela 4 Medidas morfológicas e das estruturas anatômicas em secção transversal do colmo de diferentes populações de <i>S. villosum</i>	43

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Dados de coleta das populações das espécies de <i>Saccharum</i>	64
Tabela 2 Comprimentos das estruturas epidérmicas e medidas morfológicas do colmo das espécies de <i>Saccharum</i>	65
Tabela 3 Proporções de tecidos do colmo das espécies de <i>Saccharum</i>	65

CAPÍTULO 3

Tabela 1 Teores de carboidratos não estruturais e lignina nos colmos das espécies nativas de <i>Saccharum</i>	84
--	----

CAPÍTULO 4

Tabela 1 Análise comparativa das medidas anatômicas dos colmos das cultivares RB 86-7515 e SP 79-1011	102
Tabela 2 Teores de carboidratos não estruturais e lignina nos colmos das cultivares RB 86-7515 e SP 79-1011	102

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3. OBJETIVO GERAL	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
5. CAPÍTULO 1	
Diversidade Morfológica e Anatômica do colmo de <i>Saccharum villosum</i> Steud. (Poaceae)	23
6. CAPÍTULO 2	
Caracterização estrutural do colmo das espécies brasileiras de <i>Saccharum</i> L. (Poaceae)	48
7. CAPÍTULO 3	
Parede celular e teores de carboidratos não estruturais, lignina e silício em colmos das espécies brasileiras de <i>Saccharum</i> L. (Poaceae)	71
8. CAPÍTULO 4	
Anatomia e bioquímica dos colmos de duas cultivares brasileiras de cana-de- açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> spp.)	88
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	106

1. INTRODUÇÃO

As primeiras plantas a serem cultivadas datam de cerca de 10.000 anos (Doggett, 1970). Desde então, inúmeras cultivares de plantas domesticadas foram desenvolvidas para prover a demanda de alimento para homens e outros animais, fibras e matérias-primas (Dillon *et al.*, 2007). Dentre as cultivares desenvolvidas, destaca-se o cultivo de grãos, pertencentes às Poaceae (Gramineae).

O significado econômico das Poaceae é bastante expressivo, cerca de 50 gêneros são normalmente mencionados como fonte de alimentação, em torno de 20 são relacionados como pastagens e, 17 são listados como cereais (Watson & Dallwitz, 1992). Em termos de produção mundial, as quatro maiores culturas são gramíneas – cana-de-açúcar, trigo, arroz e milho (Judd *et al.*, 1999).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é originária do sudeste da Ásia e Nova Guiné (Lebot, 1999). Desde o ciclo do açúcar no Brasil Colônia trata-se de uma cultura economicamente importante, pelos seus colmos que acumulam sacarose (Grivet & Arruda, 2001; Orellana & Bonalume-Neto, 2006), sendo a cultura líder para produção do açúcar, crescendo em áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo (Dillon *et al.*, 2007) e tendo o Brasil como o seu maior produtor (Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011).

A importância da cana-de-açúcar pode ser atribuída à sua múltipla utilização, podendo ser empregada *in natura*, sob a forma de forragem, para a alimentação animal, ou como matéria-prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, açúcar e álcool. O consumo mundial de açúcar e etanol, somado à demanda social pela preservação ambiental, faz da cana-de-açúcar uma cultura em expansão. Para aumentar a produção sem ampliar a área de cultivo é preciso um maior conhecimento das espécies e variedades dessa cultura.

Um aspecto que atualmente favorece o crescimento e desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar é o fato de seus produtos, principalmente o etanol, representarem exemplos de recursos energéticos renováveis. De acordo com Goldemberg (2007), o aumento do uso de fontes de energia renováveis, principalmente nos países em desenvolvimento, terá como consequência a geração de energia compatível com o desenvolvimento sustentável, definido pela Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (WCED, 1987) como aquele capaz de suprir as

necessidades da geração atual, sem comprometer a capacidade de atender às necessidades das futuras gerações.

A substituição do uso dos recursos energéticos não renováveis pelos renováveis poderia ser alcançada através da replicação do programa de etanol a partir da cana-de-açúcar, começado no Brasil nos anos 1970. Esta substituição torna-se necessária uma vez que mais de 80% do suprimento energético mundial deriva de combustíveis fósseis, que não são renováveis e ocasionam sérios problemas ambientais. Já os recursos renováveis são menos poluentes e, normalmente requerem maior quantidade de mão-de-obra, promovendo, assim, maior oferta de empregos (Goldemberg, 2007).

Martins & Castro (1999) afirmam que, historicamente, as pesquisas agrícolas têm sido voltadas principalmente para a obtenção de maiores incrementos na produção total desta cultura e extração de seus subprodutos a partir do colmo (açúcar, álcool, celulose e biogás), mediante o aprimoramento das técnicas agrônomicas convencionais para otimizar as produções.

A procura de variedades resistentes e mais produtivas de cana-de-açúcar levou ao aparecimento de centenas de novas cultivares (De Almeida & Crócomo, 1994). Todas as cultivares são híbridos de *Saccharum*, principalmente do cruzamento entre *S. officinarum* L. e *S. spontaneum* L. (D'Hont *et al.*, 1996), nos quais procura-se obter, além das características agrônomicas de produtividade, rusticidade, resistência a pragas e a doenças, algumas características industriais como alto teor de sacarose e teor médio de fibra, condições essenciais para uma boa exploração (Stupiello, 1987).

Uma das maneiras de alcançar o progresso do setor agropecuário é a utilização de híbridos entre as cultivares e espécies nativas não cultivadas relacionadas, as quais são fontes de diversidade de germoplasma (Nassar *et al.*, 2008). A introdução de novos germoplasmas pode promover desenvolvimento e melhoria nos cultivares de cana-de-açúcar (Tai & Miller, 2002). Além das duas espécies supracitadas, há outras espécies ainda não exploradas, que podem representar diversidade de germoplasma e melhorias para a cultura de cana-de-açúcar. Para tanto, é necessário conhecer as características morfológicas, anatômicas e bioquímicas das espécies nativas não cultivadas.

No Brasil ocorrem 3 espécies de *Saccharum* L. – *S. angustifolium* (Nees) Trin., *S. asperum* (Nees) Steud. e *S. villosum* Steud. (Filgueiras, 2003; Filgueiras *et al.*, 2010). Porém, as informações sobre essas espécies são escassas ou até mesmo ausentes, o que dificulta a distinção entre elas, ou então uma possível utilização das mesmas, visando

obtenção de resultados em programas de melhoramento para a cultura. Estes aspectos justificam o estudo mais detalhado e comparativo da morfologia, anatomia e bioquímica do colmo das espécies brasileiras do gênero.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Poaceae é uma das maiores famílias entre as angiospermas, possui cerca de 700 gêneros e 10.000 espécies (Souza & Lorenzi, 2008), para o Brasil são citados 204 gêneros e 1.401 espécies (Filgueiras *et al.*, 2010). O conhecimento das Poaceae é, sem dúvida, um dos fatores essenciais para o progresso do setor agropecuário, levando ao uso mais conveniente e melhoramento das forragens e pastagens (Rizzini, 1975).

Devido ao elevado número de espécies e diversidade adaptativa da família, a sua distribuição geográfica é cosmopolita, é a principal componente das formações campestres em todo o mundo, chega a 24% da vegetação da Terra, podendo ser encontrada em todos os tipos de habitat e com todos os tipos de hábito, sendo, entretanto, pouco frequentes como epífitas (Judd *et al.*, 2007). Mas, elas são especialmente abundantes nos ambientes abertos, como as savanas, dentre as quais destaca-se o Cerrado (Netto *et al.*, 2006).

Saccharum L. (Poaceae) pertence à subfamília Panicoideae, tribo Sacchareae e subtribo Saccharinae (Soreng *et al.*, 2013). Em seu sentido amplo, *Saccharum* abrange cerca de 40 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Clayton & Renvoize, 1986; Webster & Shaw, 1995), incluindo, portanto, as espécies de *Erianthus* Michx (Filgueiras, 2003; Filgueiras *et al.*, 2010). Outros autores consideram *Erianthus* separado de *Saccharum*, com aproximadamente 28 espécies ocorrentes nas Américas, África, Europa e Ásia (Mukherjee, 1958; Molina, 1981; Nicora & Rúgolo de Agrasar, 1987; Watson & Dallwitz, 1992). Percebe-se que a circunscrição de *Saccharum* e *Erianthus* é controversa, e como ainda não há um estudo filogenético conclusivo, *Saccharum* será considerado em seu sentido amplo.

Em taxonomia os caracteres morfológicos são utilizados para identificação e definição de possíveis inter-relações entre grupos. Nas análises anatômicas, algumas estruturas são usualmente constantes em diferentes partes da planta, e são mais confiáveis do que os caracteres exomorfológicos empregados na taxonomia (Van Cotthem, 1970).

O valor dos caracteres anatômicos na sistemática das Poaceae tem sido destacado por diversos autores (Brown, 1958; Tateoka, 1958; Tateoka *et al.*, 1959; Metcalfe, 1960; Cutler, 1972; Ellis, 1976 e 1979; Renvoize, 1982 e 1987; Zuloaga *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2008). Desde que Avdulov (1931) revelou a importância dos mesmos, frente àqueles relativos à flor e inflorescência tradicionalmente utilizados, várias características foram introduzidas como a estrutura do caule e variações estruturais do mesofilo e da epiderme foliar (Milby, 1971; Cutler, 1972; Palmer & Tucker, 1983; Guma *et al.*, 1995; Mensah & Gill, 1997; Rúgolo de Agrasar & Rodríguez, 2003; Namaganda *et al.*, 2009).

A anatomia dos órgãos vegetativos da cana-de-açúcar foi apresentada por Artschwager (1925), mas não houve aplicação taxonômica neste estudo. Diversos trabalhos abordam o melhoramento das cultivares por meio de aplicação de hormônios e outros compostos (Millhollon & Koike, 1985; Richard, 1991). Martins & Castro (1999) analisaram as diferenças anatômicas da lâmina foliar, nó e entrenó de um cultivar da cana-de-açúcar mediante aplicações de diferentes concentrações de giberelina e ethephon. Bull *et al.* (1972) verificaram o movimento lateral de água e açúcares através do xilema. Oworu *et al.* (1977a,b) apresentaram diferenças nas taxas de sacarose de clones de cana-de-açúcar *in vitro*, e a suas relações com a anatomia dos tecidos de reserva. Moore & Cosgrove (1991) analisaram as mudanças nas células do parênquima de reserva de caules em diferentes estágios de desenvolvimento; Jacobsen *et al.* (1992) encontraram mudanças anatômicas ao longo do desenvolvimento do caule em relação ao floema e parênquima de reserva.

As propriedades dos colmos podem ser determinadas pelas suas estruturas anatômicas, as quais geralmente refletem a aplicabilidade tecnológica desses órgãos (Liese & Grosser, 2000), como por exemplo, o conteúdo e diâmetro das fibras podem determinar uma maior resistência mecânica (Liese, 1998). Uma importante estrutura é a parede celular de fibras e células parenquimáticas, que é caracterizada pela alternância na orientação de microfibrilas de celulose, resultando em uma estrutura resistente à alta tensão (Gritsch & Murphy, 2005).

3. OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo morfológico, anatômico e bioquímico do colmo das espécies *S. angustifolium*, *S. asperum*, *S. villosum* (Fig. 1) e de duas cultivares de cana-de-açúcar

(SP 79-1011 e RB 86-7515), efetuar análise comparativa entre essas amostras, com o intuito de fornecer meios para a identificação desses táxons, como subsídios para estudos ecológicos e filogenéticos, além de, em trabalhos futuros, verificar quais cruzamentos interespecíficos podem ser viabilizados para melhorar a cultura da cana-de-açúcar.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Artschwager, E. 1925. Anatomy of the vegetative organs of sugar cane. **Journal of Agricultural Research** 30: 197-221.
- Avdulov, N.P. 1931. Karyo-systematische Untersuchungen der Familie Gramineen. **Bulletin of Applied Botany** 44: 428pp.
- Brown, W.V. 1958. Leaf anatomy in grass systematic. **Botanical Gazette** 119: 170-178.
- Bull, T.A.; Gayler, .R. & Glasziou, K.T. 1972. Lateral movement of water and sugar across xylem in sugarcane stalks. **Plant Physiology** 49: 1007-1011.
- Cheavegatti-Gianotto, A.; Couto de Abreu, H.M.; Arruda, P.; Bernaldo Filho, J.C.; Burnquist, W.L.; Creste, S.; di Ciero, L.; Ferro, J.A.; Figueira, A.V.O.; Filgueiras, T.S.; Grossi-de-Sá, M.F.; Guzzo, E.C.; Hoffmann, H.P.; Landell, M.G.A.; Macedo, N.; Matsuoka, S.; Reinach, F.C.; Romano, E.; Silva, W.J.; Silva Filho, M.C. & Ulian, E.C. 2011. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology** 4: 62-89.
- Clayton, W.D. & Renvoize, S.A. 1986. **Genera graminum**: grasses of the world. London: Her Majesty's Stationery Office.
- Cutler, D.F. 1972. Leaf anatomy of certain *Aloe* and *Gasteria* species and their hybrids. In: Ghouse, A.K.M. & Yunus, M. (eds.). **Research Trends in Plant Anatomy**. New Delhi: McGraw-Hill.
- De Almeida, M. & Crócomo, O.J. 1994. Caracterização bioquímica de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.): isoenzimas, proteína solúvel e valor Brix. **Scientia Agricola** 51(3): 422-429.
- D'Hont, A.; Grivet, L.; Feldmann, P.; Rao, S.; Berding, N. & Glaszmann, J.C. 1996. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics** 250: 405-413.

- Dillon, S.L.; Shapter, F.M.; Henry, R.J.; Cordeiro, G.; Izquierdo, L. & Lee, S. 2007. Domestication to crop improvement: genetic resources for *Sorghum* and *Saccharum* (Andropogonae). **Annals of Botany** 100: 975-989.
- Doggett, H. 1970. **Sorghum**. London: Longman.
- Ellis, R.P. 1976. A procedure to standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. I. The leaf-blade as viewed in transverse section. **Bothalia** 12(1): 65-109.
- Ellis, R.P. 1979. A procedure to standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. II. The epidermis as seen in surface view. **Bothalia** 12(4): 641-671.
- Filgueiras, T.S. 2003. *Saccharum* L. In: **Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae and Danthoioideae** (F.O. Zuloaga; O. Morrone; G. Davidse; T.S. Filgueiras; P.M. Peterson; R.J. Soreng & E.J. Judziewicz). Washington: Contributions from the United States National Herbarium. 550-557.
- Filgueiras, T.S.; Longhi-Wagner, H.M.; Viana, P.L.; Zanin, A.; Guglieri, A.; Oliveira, R.C.; Canto-Dorow, T.S.; Shirasuna, R.T.; Valls, J.F.M. & Oliveira, R.P. 2010. **Poaceae**. In: Forzza, R.C. (eds) Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Vol. 2. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 1464-1520.
- Goldemberg, J. 2007. Ethanol for a sustainable energy future. **Science** 315: 808-810.
- Gritsch, C.S. & Murphy, R.J. 2005. Ultrastructure of fibre and parenchyma cell walls during early stages of culm development in *Dendrocalamus asper*. **Annals of Botany** 95: 19-629.
- Grivet, L. & Arruda, P. 2001. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology** 5: 122-127.
- Guma, I.R.; Echarte, A.M. & Clausen, A.M. 1995. Análisis multivariado de caracteres epidérmicos foliares de *Paspalum distichum* y *Paspalum vaginatum* (Poaceae). **Darwiniana** 33(4): 353-371.
- Jacobsen, K.R.; Fisher, D.G.; Maretzki, A. & Moore, P.H. 1992. Developmental changes in the anatomy of the sugarcane stem in relation to phloem unloading and sucrose storage. **Botanica Acta** 105: 70-80.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. & Stevens, P.F. 1999. **Plant Systematics – a phylogenetic approach**. Massachusetts: Publishers Sunderland. Sinaer Associates, Inc.

- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A., Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2007. **Plant Systematics** – a phylogenetic approach. 3rd Edition. Massachusetts: Publishers Sunderland. Sinaer Associates, Inc.
- Lebot, V. 1999. Biomolecular evidence for plant domestication in Sahul. **Genetic Resources and Crop Evolution** 46: 619-628.
- Liese, W. 1998. **The anatomy of bamboo culms**. Beijing: INBAR Technical Report n° 18. International Network for Bamboo and Rattan.
- Liese, W. & Grooser, D. 2000. **An expanded typology for the vascular bundles of bamboo culms**. Chiangmai: Proceedigs of the Bamboo 2000 International Symposium.
- Martins, M.B.G & Castro, P.R.C. 1999. Efeitos de giberelina e ethephon na anatomia de plantas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 34(10): 1855-1863.
- Mensah, J.K. & Gill, L.S. 1997. Cuticular and leaf blade anatomical studies of the tribe Sporoboleae (Poaceae) from West Africa. **Journal of Plant Anatomy Morphology** 7(1): 72-81.
- Metcalfe, C.R. 1960. **Anatomy of the monocotyledons**. I. Gramineae. Oxford: Clarendon Press.
- Milby, TH. 1971. The leaf anatomy of Buffalo grass, *Buchloë datyloides* (Nutt.) Engelm. **Botanical Gazette** 132: 308-313.
- Millhollon, R.W. & Koike, H. 1985. Combined effect of disease and herbicide treatment on yield of sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Weed Science** 34: 137-142.
- Molina, A. M. 1981. El género *Erianthus* (Gramineae) en la Argentina y países limítrofes. **Darwiniana** 23(2-4): 559-585.
- Moore, P.H. & Cosgrove, D.J. 1991. Developmental changes in cell and tissue water relations parameters in storage parenchyma of sugarcane. **Plant Physiology** 96: 794-801.
- Mukherjee, S.K. 1958. Revision of the genus *Erianthus* Michx. (Gramineae). **Lloydia** 21(3): 157-188.
- Namaganda, M.; Krekling, T. & Lye, K.A. 2009. Leaf anatomical characteristics of ugandan species of *Festuca* L. (Poaceae). **South African Journal of Botany** 75(1): 52-59.

- Nassar, N.M.A.; Hashimoto, D.Y.C. & Fernandes, S.D.C. 2008. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research** 7(1): 16-28.
- Netto, P.B.; Mecnas, V.V. & Cardoso, E.S. (eds.). **APA de Cafuringa: a última fronteira natural do DF**. 2006. Brasília: Governo do Distrito Federal e Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos.
- Nicora, E.G. & Rúgolo de Agrasar, Z.E. 1987. **Los géneros de gramíneas de América Austral**: Argentina, Chile, Uruguay y áreas limítrofes de Bolivia, Paraguay y Brasil. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur.
- Oliveira, R.P.; Longhi-Wagner, H.M. & Leite, K.R.B. 2008. A contribuição da anatomia foliar para a taxonomia de *Raddia* Bertol. (Poaceae: Bambusoideae). **Acta Botanica Brasílica** 22(1): 1-19.
- Orellana, C. & Bonalume-Neto, R. 2006. Brazil and Japan give fuel to ethanol market. **Nature Biotechnology** 24: 232.
- Oworu, O.O.; McDavid, C.R. & MacColl, D. 1977a. A comparison of rates of storage of sucrose in eight clones of sugar-cane as measured by sucrose uptake *in vitro*. **Annals of Botany** 41: 393-399.
- Oworu, O.O.; McDavid, C.R. & MacColl, D. 1977b. The anatomy of the storage tissue of sugar-cane in relation to sugar uptake. **Annals of Botany** 41: 401-404.
- Palmer, P.G. & Tucker, A.E. 1983. A scanning electron microscope survey of the epidermis of East African grasses. I. **Smithsonian Contributions to Botany** 53: 1-72.
- Renvoize, S.A. 1982. A survey of leaf-blade in grasses. II. Arundinelleae. **Kew Bulletin** 37(3): 489-495.
- Renvoize, S.A. 1987. A survey of leaf-blade in grasses. XI. Paniceae. **Kew Bulletin** 42(3): 739-768.
- Richard, E.P., Jr. 1991. Sensitivity of sugarcane (*Saccharum* sp.) to glyphosate. **Weed Science** 39: 73-77.
- Rizzini, C.T. 1975. Contribuição ao conhecimento da estrutura do Cerrado. **Brasil Florestal** 6(22): 3-15.d
- Rúgolo de Agrasar, Z.E. & Rogríguez, M.F. 2003. Culm anatomy of native woody bamboos in Argentina and neighboring areas: cross section. **The Journal of the American Bamboo Society** 17(1): 28-43.

- Soreng, R.J.; Davidse, G.; Peterson, P.M.; Zuloaga, O.; Judziewicz, E.J.; Filgueiras, T.S.; Morrone, O. & Romaschenko, K. 2013. A world-wide phylogeny classification of Poaceae (Gramineae). Disponível em: <http://www.tropicos.org/projectwebportal.aspx?pagename=ClassificationNWG&projectid=10>. Acessado em 06 dez 2013.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2008. **Botânica Sistemática**. 2ª ed. São Paulo: Ipef.
- Stupiello, J.P. 1987. A cana-de-açúcar como matéria prima. In: Paranhos, S.B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. São Paulo: Fundação Cargill.761-804.
- Tai, P.Y.P. & Miller, J.D. 2002. Germplasm diversity among for sugarcane species for sugar composition. **Crop Science** 42: 958-964.
- Tateoka, T. 1958. Notes on some grasses. VIII. On leaf structure of *Arundinella* and *Garnotia*. **Botanical Gazette** 120(2): 101-109.
- Tateoka, T.; Inoue, S. & Kawano, S. 1959. Notes on some grasses. IX. Systematic significance of bicellular microhairs of leaf epidermis. **Botanical Gazette** 121(2): 80-91.
- Van Cotthem, W. 1970. A classification of stomatal types. **Botanical Journal of the Linnean Society** 63: 235-246.
- Watson, L. & Dallwitz, M.J. 1992. **The grass genera of the world**. C.A.B. International, Tucson.
- WCED – **World Commission on Environment and Development** - Our common Future. 1987. Oxford: Oxford University Press.
- Webster, R. D. & Shaw, R. B. 1995. Taxonomy of the native North American species of *Saccharum* (Poaceae: Andropogoneae). **Sida** 16(3): 551-580.
- Zuloaga, F.O.; Morrone, O.; Vega, A.S. & Giussani, L.M. 1998. Revisión y análisis cladístico de *Steinchisma* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** 85: 631-656.

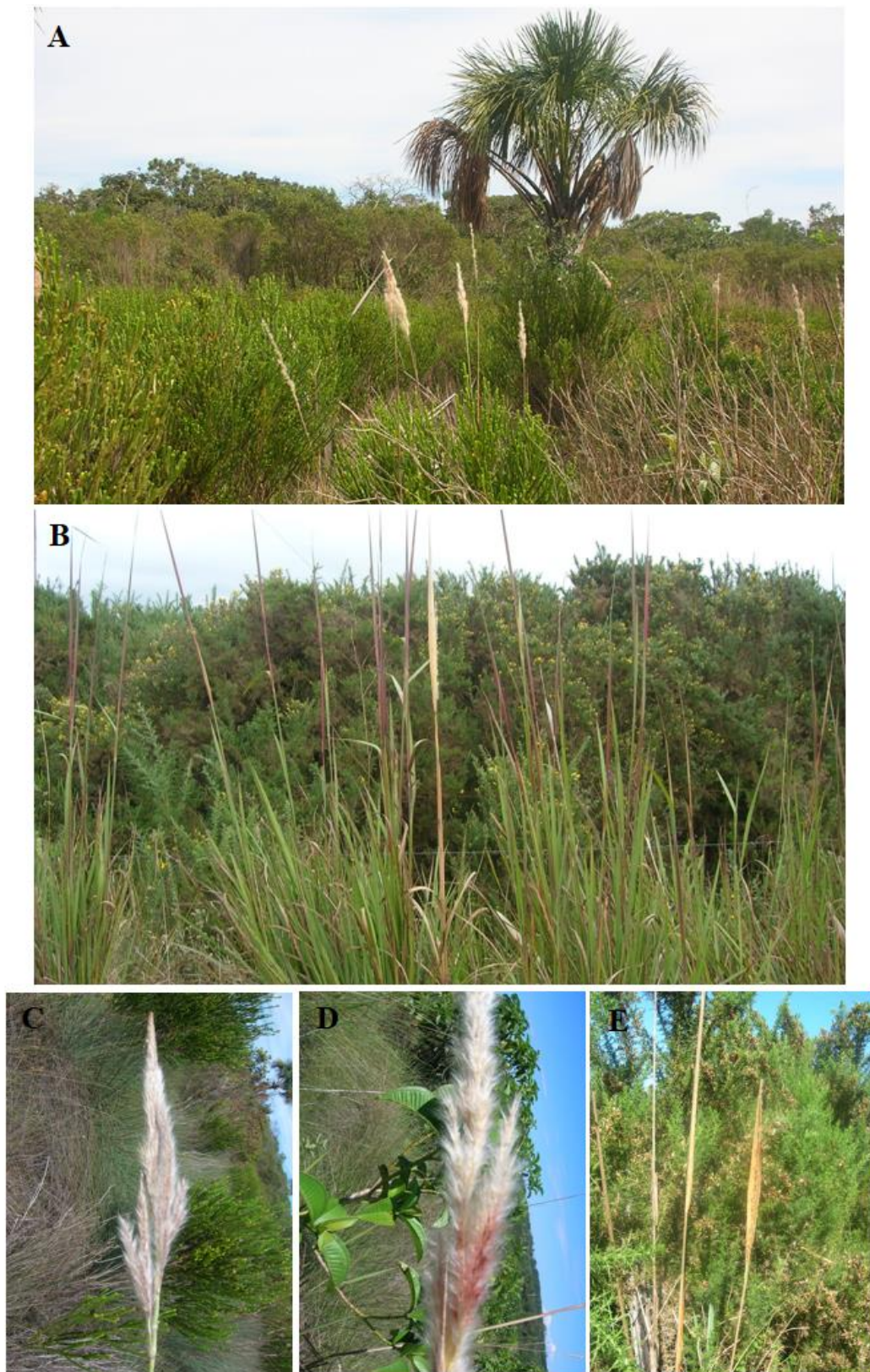


Fig. 1 Aspectos morfológicos das espécies brasileiras de *Saccharum*. a ambiente natural de *S. villosum*. b ambiente natural de *S. angustifolium*. c inflorescência de *S. villosum*. d inflorescência de *S. asperum*. e inflorescência de *S. angustifolium*.

5. CAPÍTULO 1*

*Para este capítulo seguiram-se as normas do periódico Australian Journal of Botany.

Silvia Dias da Costa Fernandes

Diversidade Morfológica e Anatômica do Colmo de *Saccharum villosum* Steud. (Poaceae)

Resumo No Brasil ocorrem três espécies nativas de *Saccharum* (Poaceae), dentre elas, *S. villosum* é a que apresenta maior distribuição geográfica, sendo encontrada da região sul a nordeste, principalmente no Cerrado e Mata Atlântica. Diferentes populações desta espécie podem apresentar alta variabilidade em suas características morfológicas, seja por tamanho ou caracteres distintos, o que dificulta sua identificação. A anatomia pode ser uma ferramenta para subsidiar a taxonomia das gramíneas, para as espécies nativas de *Saccharum* há poucos estudos anatômicos, e estes não apresentam fins taxonômicos. Este trabalho tem como objetivo descrever a estrutura do colmo de 22 populações de *S. villosum* para verificar possíveis variações intraespecíficas e proporcionar um melhor conhecimento acerca do gênero. Foram analisados fragmentos da epiderme em microscopia óptica e eletrônica de varredura, além de secções transversais do colmo. A epiderme foi o tecido que mostrou maior diversidade entre as populações analisadas. Populações de uma mesma região podem possuir diferentes tipos de tricomas e proporções distintas de esclerênquima, enquanto populações de regiões distantes podem ser bastante semelhantes. Pode-se afirmar que a espécie apresenta alta diversidade micromorfológica na epiderme do colmo, e que as diferenças observadas não estão relacionadas apenas com a localização geográfica da população. Desta forma novos trabalhos taxonômicos moleculares devem ser feitos no “complexo *Saccharum villosum*” para melhor delimitar a circunscrição da espécie.

Palavras-chave Colmo · Gramineae · Micromorfologia · Variação intraespecífica

Introdução

Poaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, para o Brasil são listados 204 gêneros e 1.401 espécies (Filgueiras et al. 2010). Dentre as Poaceae, *Saccharum* L. é um gênero de grande importância econômica, mas do ponto de vista taxonômico ainda há controvérsias sobre sua circunscrição, uma vez que espécies que pertenciam a outros gêneros foram transferidas para *Saccharum* (Cheavegatti-Gianotto et al. 2011).

A maioria das cultivares de cana-de-açúcar é derivada do cruzamento interespecífico entre *S. officinarum* L. e *S. spontaneum* L. (D’Hont et al. 1996). No entanto, há outras espécies ainda não exploradas, que podem representar diversidade de

germoplasma e melhorias para a cultura. Para tanto, é necessário conhecer, entre outras características, os aspectos anatômicos das espécies nativas não cultivadas.

No Brasil ocorrem 3 espécies nativas de *Saccharum* – *S. angustifolium* (Nees) Trin., *S. asperum* (Nees) Steud. e *S. villosum* Steud. (Filgueiras e Welker 2012), esta última é a mais abundante, sendo encontrada da região sul a nordeste, principalmente no Cerrado e Mata Atlântica. Porém, as informações sobre esta espécie são escassas, estando presente apenas em levantamentos florísticos, o que dificulta sua identificação e até sua possível utilização em programas de melhoramento da cultura (Cheavegatti-Gianotto et al. 2011).

Diversas espécies têm sido consideradas sinônimos de *S. villosum*, como por exemplo, *Erianthus balansae* Hack., *E. clandestinus* Swallen, *E. glabrinodes* (Hack.) Swallen, *E. purpureus* Swallen, algumas subvariedades de *E. saccharoides* Michx. e de *E. trinii*, *Saccharum balansae* (Hack.) Roberty, *S. giganteum* Trin. Ex Hack. e *S. trinii* (Hack.) Renvoize (Filgueiras, 2003), o que promove alta variabilidade nas características morfológicas e, conseqüentemente, possíveis dificuldades na identificação.

As gramíneas são comumente identificadas com base em seus caracteres florais, o que pode constituir um problema, já que a inflorescência não persiste por um grande período do ciclo de vida dos indivíduos dessa família. Portanto, a utilização da anatomia como subsídio para a taxonomia pode ser efetiva, pois permite o reconhecimento do táxon quando as estruturas reprodutivas não estão disponíveis (Metcalf 1960), além de que nas análises anatômicas, algumas estruturas são usualmente constantes em diferentes partes da planta, podendo ser mais confiáveis do que os caracteres da morfologia externa (Watson et al. 1985).

Os estudos anatômicos dos órgãos vegetativos de *Saccharum* são relativamente escassos, os mais frequentes abordam a lâmina foliar de cultivares de cana-de-açúcar e não apresentam fins taxonômicos (Artschwager 1925; Metcalf 1960; Merida 1970; Ferreira et al. 2005; 2007; García e Jáuregui 2008). Desta forma, este trabalho tem como objetivo descrever a estrutura do colmo de 22 populações de *S. villosum*, verificar possíveis variações intraespecíficas, relacionar as estruturas anatômicas com os respectivos ambientes e proporcionar um melhor conhecimento acerca do gênero.

Material e métodos

Foram coletados 3 colmos de cada uma das 22 populações de *S. villosum* encontradas em diferentes localidades brasileiras, identificadas pelos respectivos números de coleta e depositadas no herbário da Universidade de Brasília – UB (Tabela 1). No campo, foram medidos o comprimento total do colmo e diâmetro, espessura da parede e comprimento dos 2º e 3º entrenós (contados a partir da inflorescência), sendo que amostras das regiões medianas desses entrenós foram preservadas em álcool etílico 70% para análise anatômica. Os fragmentos da epiderme foram obtidos com solução de Franklin (Kraus e Arduin 1997) a 60°C e corados com azul de metileno e bórax (1% aquoso, Langeron 1949). As secções transversais foram realizadas à mão livre em micrótomo de mesa, clarificadas com solução de hipoclorito de sódio (50% aquosa, Kraus e Arduin 1997) e coradas com safranina e azul de alcião (1% aquosos, Luque et al. 1996). Ambas as secções foram desidratadas em série etílica, diafanizadas em acetato de butila e montadas entre lâmina e lamínula em resina sintética (Paiva et al. 2006).

Para complementar a análise anatômica foram observados caracteres micromorfológicos. As amostras foram desidratadas em série acetônica crescente até a saturação, secas ao ponto crítico, montadas em porta espécimen, cobertas com ouro ou grafite, e examinadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-7001F.

Os caracteres analisados foram os indicados no roteiro desenvolvido por Graciano-Ribeiro et al. (2006) e a terminologia utilizada seguiu Ellis (1976; 1979). As fotomicrografias foram obtidas com auxílio do microscópio Olympus CX 31 acoplado à máquina digital. Para cada população, em vista frontal da epiderme, foram tomadas 25 medidas dos comprimentos das células longas, silicificadas, tricomas e complexos estomáticos. Nas secções transversais foram quantificadas as proporções de tecidos parenquimático, esclerenquimático e vascular de 3 campos distintos de cada uma das regiões do sistema vascular: periférica, intermediária e central. Todas essas medidas foram tomadas com o auxílio do programa de análise de imagens Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics 2009).

A determinação das diferenças das populações, para todas as variáveis estudadas, foi realizada por análise de variância (ANOVA) e comparação das médias com pós-teste Tukey, assumindo probabilidade de erro de 5% ($p < 0,05$). A fim de detectar o grau de similaridade entre as populações, foi realizada análise de

agrupamento com as médias padronizadas das variáveis, para as estruturas inexistentes em algumas populações foi atribuído valor zero, foi utilizada a técnica de ligação de média de grupos (UPGMA) e a medida de similaridade foi “linkage distance”, transformada para porcentagem, o resultado desta análise foi apresentado na forma de dendograma. Todas essas análises foram feitas com auxílio do programa Statistica 8.0 (Hill e Lewicki 2007).

Resultados

Devido à alta variabilidade nas características morfológicas de *S. villosum*, podem ocorrer dificuldades na identificação. Essas dificuldades foram encontradas pelas autoras durante as coletas, uma vez que as populações apresentaram muita diversidade, tanto em relação a tamanho quanto a caracteres morfológicos, o que levou a acreditar que poderiam ser espécies distintas.

A epiderme caulinar é composta por células comuns longas, curtas dos tipos silicificadas e suberosas, complexos estomáticos e tricomas, sendo possível caracterizar duas zonas distintas - costal e intercostal. Em ambas as zonas ocorrem células comuns longas, curtas dos tipos silicificadas e suberosas. Complexos estomáticos e tricomas estão restritos à zona intercostal (Fig. 1). As células epidérmicas costais apresentam menor grau de sinuosidade das paredes quando comparadas às intercostais (Fig. 1c).

As células longas apresentam formatos homogêneos e tamanhos distintos, suas paredes celulares não são espessadas e as sinuosidades das paredes são irregulares (Tabela 2; Fig. 1). As células curtas, complexos estomáticos e tricomas estão presentes entre as células longas de uma mesma fileira, de forma não padronizada (Fig. 1; 2). As células curtas podem estar solitárias ou em conjunto de até 5 células, cada conjunto comporta apenas células silicificadas ou intercala célula silicificada com suberosa e/ou tricoma (Fig. 1e; 2c; d). As células silicificadas apresentam superfície crenada, principalmente nas paredes anticlinais verticais, e os formatos variados: retangular estreito a largo, cruciforme, e, menos frequente, halteriforme com superfície lisa (Fig. 1c; 2d; Tabela 3). As células suberosas são quadradas e podem estar isoladas entre duas longas ou formar o par sílico-suberoso (Fig. 1d).

Os complexos estomáticos apresentam a forma de cúpula das células subsidiárias como a mais comum, mas também podem apresentar paredes horizontais retas ou forma irregular na mesma população (Fig. 1c-d; Tabela 3). Independentemente da população, apresentam distribuição não padronizada ao longo de toda zona

intercostal (Fig. 1; 2) e são caracterizados pela deposição de sílica nas células-guarda e subsidiárias (Fig. 1; c-d). As células interestomáticas são semelhantes às células longas intercostais, mas apresentam as extremidades de suas paredes côncavas, encaixando ao redor do complexo estomático (Fig. 1c-d).

Os tricomas são de tamanhos variados, podem ser microtricomas, macrotricomas ou do tipo espinho (Fig. 1-2). Os microtricomas são do tipo eupanicoide, apresentam tamanhos variados (Tabela 2), mas as células basal e distal têm aproximadamente o mesmo comprimento, ocorrem entre duas células longas ou entre célula longa e interestomática, a inserção da célula basal é em forma de círculo (Fig. 1a; e; 2d; e), a célula distal tem formato de bastão e sua parede fina muitas vezes é perdida durante a preparação histológica (Fig. 1e). Apenas a população 214 carece deste tipo de tricoma (Tabela 2; Fig. 1d).

Os macrotricomas apresentam tamanhos e densidades variados, podem apresentar uma, duas ou várias células associadas à base, sendo que é possível dois macrotricomas terem a mesma base (Fig. 1b; f; Tabela 2; 3), estes tricomas estão ausentes nas populações 185, 214 e 254 (Fig. 1d; Tabela 2; 3). O único tipo de tricoma presente em todas as populações analisadas são os espinhos, no sentido amplo do termo são estruturas pontiagudas com base elíptica a arredondada, apresentam deposição de sílica no ápice e diferentes tamanhos (Fig. 1a; c; e; 2; Tabela 2), quanto à forma podem ser classificados em espinhos e ganchos, sendo que os ganchos apresentam ápice curvo e são geralmente menores que os espinhos, algumas populações apresentam espinhos bastante longos (Fig. 1e; 2f; Tabela 3).

Os colmos são circulares, ocos na porção mediana do entrenó e maciços nas regiões próximas aos nós, o comprimento total e o comprimento e a espessura da parede dos entrenós variam entre as populações (Tabela 4). Em secção transversal observam-se epiderme, córtex e sistema vascular (Fig. 3). A superfície pode ser lisa ou apresentar saliências na zona costal e reentrâncias na zona intercostal (Fig. 3a-d).

A epiderme é uniestratificada, recoberta por cutícula lisa e delgada, sendo constituída pelos tipos celulares já descritos na vista frontal. As células epidérmicas comuns têm formato arredondado a quadrado, paredes espessadas e lignificadas, na zona costal essas células apresentam menor volume, tanto que eventualmente não é possível visualizar o lúmen celular (Fig. 3d). As células silicificadas são retangulares e com volume similar às epidérmicas comuns. Os complexos estomáticos estão nivelados

em relação às demais células epidérmicas, podendo ocorrer pequena cavidade subestomática (Fig. 3c-d).

O córtex possui cerca de 3 camadas celulares, com diferentes proporções de parênquima e esclerênquima (Fig. 3a-d). Nos espécimes que apresentam mais esclerênquima, o parênquima está organizado em pequenos grupos adjacentes à zona intercostal (Fig. 3d). Nos espécimes com mais parênquima, ocorrem calotas de esclerênquima nos traços foliares e feixes vasculares periféricos (Fig. 3c).

O sistema vascular é do tipo atactostelo, formado por traços foliares e feixes vasculares colaterais imersos, aleatoriamente, em tecido parenquimático. Os traços foliares são circundados por esclerênquima, podendo haver conexão com o esclerênquima do feixe vascular adjacente, normalmente apresentam dois elementos de vaso do metaxilema e carecem de lacuna do protoxilema, ou apenas tecido floemático sendo constituídos por elementos de tubo crivado e células companheiras (Fig. 3b-c).

Da região periférica em direção à central a densidade dos feixes vasculares e o espessamento das paredes das células circundantes diminuem, enquanto o tamanho dos feixes vasculares e o volume das células parenquimáticas onde estão imersos aumentam. Os feixes vasculares periféricos têm formato circular e os centrais são alongados (Fig. 3). A bainha dos feixes vasculares é formada por células esclerenquimáticas e parenquimáticas, a proporção esclerênquima/parênquima é menor nos feixes centrais (Fig. 3f). Em todo o sistema vascular, a maioria dos feixes vasculares evidencia protoxilema com lacuna e 2 elementos de vaso do metaxilema, raramente ocorrem 3, sendo 2 geminados. O floema primário geralmente está voltado para a epiderme e ocupa cerca da metade do volume do feixe vascular (Fig. 3c-f).

As medidas das estruturas epidérmicas das populações de *S. villosum* foram distintas, algumas populações apresentaram diferenças significativas, quando comparadas a todas as demais, em relação a determinadas variáveis (Tabela 2). As proporções de tecidos nas regiões periférica e intermediária do sistema vascular foram as variáveis responsáveis pela maior quantidade de populações com diferenças significativas entre si (Tabela 4).

A análise de agrupamento permitiu categorizar as populações baseado em suas similaridades (Fig. 4). O ramo A é constituído apenas pela população 214, uma vez que é a única que carece de microtricomias, além de possuir as menores células silicificadas e a menor proporção de esclerênquima na região periférica do sistema vascular. O

segundo ramo é composto por todas as outras populações, sendo dividido em 2 grupos, B e C, cada um com subdivisões ao nível de 60% de similaridade.

O grupo B é constituído pelas populações com menores comprimento total e dos entrenós, associado a menores comprimentos ou ausência dos macrotricomas. Este grupo é dividido em B₁ e B₂, principalmente pela variável diâmetro, estando em B₁ as populações com menor diâmetro e em B₂, as com maior diâmetro dos entrenós.

O grupo C abrange as populações com maiores comprimentos total, dos entrenós e dos macrotricomas. Este grupo é dividido em dois ramos, C₁ que comporta apenas a população 226 devido às maiores células longas, complexos estomáticos e microtricomas, e o outro ramos subdividido em C₂ e C₃. C₂ comporta o maior número de populações e é caracterizado pelos maiores comprimentos dos entrenós e espinhos e menores diâmetro e espessura da parede dos entrenós. C₃ abrange as populações com os menores espinhos e maiores diâmetros dos entrenós.

Discussão

Apesar da alta diversidade anatômica nas populações de *S. villosum*, algumas estruturas estão sempre presentes nos colmos, como epiderme diferenciada em zonas costal e intercostal, células silicificadas com superfície crenada e formatos cruciforme e retangular, espinhos, complexos estomáticos nivelados em relação às demais células epidérmicas e com células subsidiárias em cúpula e planas, células suberosas quadradas, córtex com parênquima e esclerênquima, e feixes vasculares revestidos por bainha única. Diversidades anatômicas dentro de populações de uma mesma espécie foram relatadas por Fahn (1982) e, como observadas em *S. villosum*, podem ser de ordem quantitativa ou qualitativa (Dickison 2000), daí a importância de avaliar um grande número de espécimes oriundos de diferentes locais para conhecer essas diversidades e determinar quais são os caracteres diagnósticos da espécie (Araújo et al. 2010).

Nas populações de *S. villosum* foram encontradas diferenças marcantes no comprimento das estruturas epidérmicas (Tabela 2), o que explica parte dos grupos gerados no dendograma (Fig. 4). No entanto, características da epiderme também apresentam valor taxonômico para separar espécies de um mesmo gênero, Hefler e Longhi-Wagner (2010) utilizaram a dimensão das células epidérmicas para separar espécies de *Cyperus* L. subg. *Cyperus*. Apesar de os autores terem analisado a lâmina foliar, as células que apresentaram diferenças foram as mesmas do colmo de *S. villosum*.

O formato das células epidérmicas longas é uniforme, o que está de acordo com Ellis (1979), que afirma que são as células curtas as que mais sofrem diferenciação e podem apresentar distinções nas comparações intra e interespecíficas, além de não apresentarem necessariamente mesmo formato e disposição nas zonas costal e intercostal de um mesmo indivíduo. As células curtas costais de *S. villosum* têm menor grau de sinuosidade das paredes que as intercostais, e podem estar tanto isoladas quanto em pares, como os sílico-suberosos, conforme descrito por Evert (2006) e Ullah et al. (2011).

As células silicificadas podem apresentar formatos distintos na epiderme do colmo das populações de *S. villosum* (Tabela 3). Artschwager (1954) conseguiu distinguir duas populações de *Saccharum sinense* Roxb. através da análise da epiderme do colmo, utilizando, dentre outras estruturas, as células silicificadas. O formato dessas células, descrito via vista frontal, é muito importante para uso taxonômico (Prychid et al. 2004), tanto que Pelegrin et al. (2009) também utilizaram esta característica para distinguir espécies de *Briza* L.

Todas as populações de *S. villosum* apresentam células silicificadas cruciformes e retangulares, mas nas populações de Brasília-DF (179 e 199), Cavalcante-GO (180) e Mambaí-GO (186) também ocorre o formato halteriforme (Tabela 3), sendo que nessas localidades ocorrem outras populações que não compartilham este formato, o que está de acordo com Piperno e Pearsall (1998), que afirmaram que o formato dessas células não é influenciado por fatores ambientais, possuindo, portanto, considerável potencial diagnóstico.

Os complexos estomáticos de *S. villosum* são paracíticos, com células-guarda halteriformes, estão restritos à zona intercostal e separados por células interestomáticas, conforme descrito por Metcalfe (1960) para a família, mas diferentemente do que ocorre nas lâminas foliares, não há fileiras contínuas de complexos estomáticos, sendo a distribuição irregular. Apesar de Ellis (1986) destacar que em lâminas foliares de Panicoideae os principais tipos de células subsidiárias apresentam o formato triangular e em cúpula, no colmo de *S. villosum* não foram observadas células triangulares, mas em cúpula, plana ou irregular, mas os diferentes formatos podem coexistir em uma mesma população, resultado também observado por Ellis (1979).

Em relação ao tamanho, os complexos estomáticos de todas as populações são considerados pequenos (< 90 µm, Santos et al. 2010), corroborando os valores 28-45

um encontrados por Watson e Dallwitz (1994) e Ullah et al. (2011) para *Saccharum*. Segundo Aliscioni (2000), as gramíneas que crescem em ambientes úmidos e sombrios apresentam complexos estomáticos maiores nas lâminas foliares, o mesmo foi constatado para o colmo da população 226, que se encontra mais ao sul do país, recebendo menor luminosidade e maior suprimento hídrico. Entretanto, algumas populações localizadas no centro-oeste brasileiro (179, 180, 183, 185) também apresentam complexos estomáticos com comprimento maior, o que é explicado por Melo et al. (2007) como resposta a diferentes estresses, uma vez que o tamanho dessas estruturas é muito variável em função do ambiente onde se encontram.

Os tricomas são as células epidérmicas que apresentam maior diversidade, macrotricomas estão presentes na maioria das populações de *S. villosum*, são todos unicelulares, mas com tamanhos, densidades e quantidade das células da base variáveis, sendo que o mesmo espécime pode apresentar uma, duas ou várias células associadas à sua base (Tabela 2; 4; Fig. 1f). Segundo Melo et al. (2007), a epiderme é um tecido bastante responsivo às alterações ambientais. Aliscioni (2000) analisando populações de *Paspalum* L., outro gênero de Poaceae, verificou que algumas espécies crescem em uma ampla diversidade de habitats e, portanto, exemplares de uma mesma espécie apresentam grande adaptação ecológica, principalmente em relação a comprimento, frequência e tipo de base dos macrotricomas.

Além da relevância taxonômica, Ghahreman et al. (2006) utilizaram formato e densidade dos macrotricomas para separar espécies de *Bromus* L. (Poaceae), esses tricomas podem representar adaptações ao meio, já que a frequência pode aumentar com a intensidade da luz, exposição ao vento e altitude (Ellis 1979). Em todas as populações de *S. villosum* cujos macrotricomas são abundantes, estes também são longos (Tabela 2; 4) e, quando são analisadas apenas as populações encontradas em maior altitude (> 1000m, Tabela 1), independente da densidade, todos são longos. A única exceção é a população 179 (Brasília-DF), que possui os menores macrotricomas, mas apresenta espinhos longos (Tabela 2) que, segundo Metcalfe (1960), podem apresentar a mesma função ecológica, neste caso de proteção contra os ventos fortes e a alta incidência solar típicos de locais de elevada altitude (Dickson 2000).

Os espinhos são o único tipo de tricomas presente em todas as populações de *S. villosum*, seus ápices são voltados para direções distintas (Tabela 3; Fig. 1a; e; 2a; c), diferente do relatado para lâminas foliares de Poaceae por Metcalfe (1960) e Ellis

(1979), que são geralmente voltados para mesma direção. Ellis (1979) e Ullah et al. (2010) citam que a presença e distribuição dos espinhos podem ser importantes para identificação e diferenciação das espécies. Outras espécies da mesma família também apresentam populações com variações no tamanho e densidade dos espinhos, como *Oryza latifolia* Desv. (Sánchez et al. 2003). Para as populações de *S. villosum* os espinhos representam uma variável importante para distinção de ramos do dendograma (Fig. 4), a população 212 (Rio Verde-GO) está em um ramo distinto das demais do seu subgrupo B₂ devido aos seus longos espinhos (Tabela 2).

Em *S. villosum*, apenas a população 214 carece de microtricomos, diferentemente do que ocorre nas lâminas foliares do gênero, que sempre portam este tipo de tricoma (Watson e Dallwitz 1994), nas demais populações esses tricomas são bicelulares e menores que 120 µm, característico de Panicoideae, corroborando com a descrição feita por Ellis (1979; 1986). A ausência de microtricomos na população 214 foi o principal fator que explica a sua posição em um ramo (A) distinto das demais populações no dendograma (Fig. 4).

De acordo com Welker e Longhi-Wagner (2012), as populações de *S. villosum* do Rio Grande do Sul apresentam grande variabilidade no que se refere ao indumento da parte vegetativa, com predomínio de plantas densamente pilosas. A população 226, também oriunda do Rio Grande do Sul apresenta os maiores tricomas, independente do tipo (Tabela 2), já nas demais populações do Goiás e Distrito Federal há diferenças significativas em relação aos tipos e tamanhos dessas células. Algumas populações do DF estão geograficamente próximas e pertencem a grupos distintos do dendograma, como 199 que pertence ao grupo B₁ e está a 10 Km de distância de 201, que pertence ao grupo C₂, semelhante ao que ocorre entre 178 (C₃) e 179 (B₂), havendo apenas 5 Km entre elas. Devido à proximidade entre essas populações, pode-se afirmar que estão submetidas a condições ambientais similares, mas apresentam densidades ou dimensões diferentes de macrotricomos (Tabela 1; 3). Assim, essas variações não são causadas apenas pelo ambiente onde as populações são encontradas.

Em secção transversal os colmos são circulares e compreendem epiderme, córtex e sistema vascular, padrão encontrado em diversas Poaceae (Metcalf 1960; Jacobsen et al. 1992; Evert 2006). O córtex é delimitado por esclerênquima associado a traços foliares e feixes vasculares, segundo Evert (2006), a distribuição do esclerênquima associado aos feixes vasculares pode estar relacionada com fatores ambientais,

gramíneas de ambientes áridos são caracterizadas por esclerênquima desenvolvido. No entanto, Welker e Longhi-Wagner (2012) comentam que *S. villosum* tem preferência por ambientes úmidos, o que foi comprovado aqui, por exemplo com a população 245 (Guará-DF; Fig. 3d), localizada às margens de um rio, não sofrendo de déficit hídrico e possuidora de grande proporção de esclerênquima no sistema vascular (Tabela 4), o que demonstra que as alterações no genótipo têm maior influência que os fatores ambientais na determinação da quantidade de esclerênquima.

As diferentes proporções de tecidos esclerenquimático, parenquimático e vascular nas regiões periférica, intermediária e central do sistema vascular das populações de *S. villosum* foram fundamentais para a construção do dendograma (Fig. 4). Entretanto, observa-se que populações próximas geograficamente ficaram em ramos distintos do dendograma, enquanto algumas populações de regiões distantes pertencem ao mesmo ramo. Baseados em dados morfológicos Welker e Longhi-Wagner (2012) citam que *S. villosum* apresenta grande diversidade, estes autores justificam que isto ocorre porque mais de uma espécie esteja envolvida dentro da sua atual descrição, corroborando assim os dados apresentados.

Hodkinson et al. (2002) citam que a taxonomia de *Saccharum* é confusa, podendo inclusive ocorrer híbridos interespecíficos e intergenéricos. De acordo com as análises morfológicas e anatômicas do colmo de populações de *S. villosum*, foram obtidos resultados muito distintos, é possível que esta variação apresentada deva-se não somente a adaptação ao ambiente, mas ao fato de espécies anteriormente consideradas distintas terem sido sinonimizadas em *S. villosum*, sugerindo que sua atual circunscrição, do ponto de vista anatômico, não está bem definida.

Conclusão

Pela análise de agrupamento foi possível distinguir grupos de populações com base nas características anatômicas do colmo de *S. villosum*, verificou-se que as variações apresentadas não seguem um padrão geográfico. Populações de mesma região geográfica podem apresentar diferenças mais marcantes que as encontradas em populações afastadas, descaracterizando a possível adaptação específica ao meio. Populações de uma mesma região, como por exemplo, de Brasília-DF (178, 179, 199 e 201), podem apresentar densidades distintas de macrotricomos, além de possuir diferentes tipos de espinhos. Assim como tipos diferenciados de células silicificadas, subsidiárias e macrotricomos ocorrem em populações de Cavalcante-GO (180, 183 e

184) e Mambaí-GO (186 e 190). Entretanto, populações de regiões distantes podem ser bastante semelhantes, como as oriundas de Gramado-RS (226) e Rio Verde-GO (210), mostrando que diferentes condições ambientais podem selecionar características anatômicas similares. Assim, pode-se afirmar que as populações de *S. villosum* apresentam grande diversidade anatômica em seu colmo, e que as diferenças observadas não estão relacionadas com a localização geográfica de cada população. Desta forma novos trabalhos taxonômicos moleculares devem ser feitos no “complexo *Saccharum villosum*” para melhor delimitar a circunscrição da espécie.

Agradecimentos ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília pela cessão de uso dos equipamentos, aos senhores Bruno Edson Chaves, Diasis Alvarenga, Joel Morato Fernandes e Vandélio Mendes pelo auxílio nos trabalhos de campo.

Referências

- Aliscioni SA (2000) Anatomía ecológica de algunas especies del género *Paspalum* (Poaceae, Panicoideae, Paniceae). *Darwiniana* 38(3-4):187-207
- Araújo JS, Azevedo AA, Silva LC, Meira RMSA (2010) Leaf anatomy as an additional taxonomy tool for 16 species of Malpighiaceae found in Cerrado area (Brazil). *Plant Syst. Evol.* 286:117-131
- Artschwager E (1925) Anatomy of vegetative organs of sugarcane. *Journal of agricultural Research* 30(3):197-241
- Artschwager E (1954) A taxonomic study of *Saccharum sinense* Roxb. and *S. barberi* Jeswiet. United States Department of Agriculture: Technical Bulletin 1089:1-87
- Cheavegatti-Gianotto A, Abreu HMC, Arruda P, Bespalhok-Filho JC, Burnquist WL, Creste S, Ciero LD, Ferro JA, Filgueira AVO, Filgueiras TS, Grossi-de-Sá MF, Guzzo EC, Hoffmann HP, Landell MGA, Macedo N, Matsuoka S, Reinach FC, Romano E, Silva WJ, Silva-Filho MC, Ulian EC (2011) Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology* 4:62–89
- D’Hont A, Grivet L, Feldmann P, Rao S, Berding N, Glaszmann JC (1996) Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics* 250:405-413

- Dickison WC (2000) Integrative plant anatomy. Academic, New York
- Ellis RP (1976) A procedure to standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae.
I. The leaf-blade as viewed in transverse section. *Bothalia* 12(1):65-109
- Ellis RP (1979) A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae.
II. The epidermis as seen in surface view. *Bothalia* 12:641-671
- Ellis RP (1986) A review of comparative leaf blade anatomy in systematic of the Poaceae: The past twenty-five years. In: Sodestrom TR, Hilu KH, Campbell CS, Barkworth ME (ed) *Grass systematics and evolution*, Smithsonian Institution Press, Washington-DC, pp 3-10
- Evert RF (2006) *Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body – their structure, function and development*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, New Jersey
- Fahn A (1982) *Plant anatomy*. Ed. 3, Pergamon, Oxford
- Ferreira EA, Demuner AJ, Silva AA, Santos JB, Ventrella MC, Marques AE, Procópio SO (2005) Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. *Planta Daninha* 23(4):611-619
- Ferreira EA, Ventrella MC, Santos JB, Barbosa MHP, Silva AA, Procópio SO, Silva EAM (2007) Leaf blade quantitative anatomy of sugarcane cultivars and clones. *Planta Daninha* 25(1):25-34
- Filgueiras TS (2003). *Saccharum* L. In: *Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae and Danthoioideae* (FO Zuloaga, O Morrone, G Davidse, TS Filgueiras, PM Peterson, RJ Soreng & EJ Judziewicz). Contributions from the United States National Herbarium, Washington, pp 550-557
- Filgueiras TS, Longhi-Wagner HM, Viana PL, Zanin A, Guglieri A, Oliveira RC, Canto-Dorow TS, Shirasuna RT, Valls JFM, Oliveira RP (2010) Poaceae. In: Forzza RC (eds) *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Vol. 2. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp 1464-1520
- Filgueiras TS, Welker CAD (2012). *Saccharum* In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB013568> (Acesso 12/01/2013).

- García M, Jáuregui D (2008) Efecto de la salinización con NaCl o Na₂SO₄ sobre la anatomia foliar em dos genotipos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) con tolerancia salina diferencial. *Ernstia* 18(1):89-105
- Ghahreman A, Alemi M, Attar F, Hamzeh'ee B, Columbus JT (2006) Anatomical studies in some species of *Bromus* L. (Poaceae) in Iran. *Iran J Bot* 12(1):1-14
- Graciano-Ribeiro D, Filgueiras TS, Gonçalves APS (2006) Roteiro mínimo para estudo anatômico dos bambus (Poaceae: Bambusoideae). In: I SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BAMBU. Universidade de Brasília, Faculdade de Arquitetura e Urbanismo, Brasília, pp 69-74
- Hefler SM, Longhi-Wagner HM (2010) A contribuição da anatomia foliar para a taxonomia das espécies de *Cyperus* L. subg. *Cyperus* (Cyperaceae) ocorrentes no sul do Brasil. *Acta Bot. Bras.* 24:708-717
- Hill T, Lewicki P (2007). *STATISTICS Methods and Applications*. Tulsa, OK: StatSoft
- Hodkinson TR, Chase MW, Lledó MD, Salamin N, Renvoize SA (2002) Phylogenetics of *Miscanthus*, *Saccharum* and related genera (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers. *J Plant Res* 115:381–392
- Jacobsen KR, Fisher DG, Maretzki A, Moore PH (1992) Developmental changes in the anatomy of the sugarcane stem in relation to phloem unloading and sucrose storage. *Botanica Acta* 105:70-80
- Kraus JE, Arduim M (1997) *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. EDUR, Seropédica
- Langeron M (1949) *Précis de Microscopie*. Ed. 7. Masson & Cie, Paris
- Luque R, Sousa HC, Kraus JE (1996) Métodos de coloração de Roeser (1972) – modificado – e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alcião 8GS ou 8GX. *Acta Botanica Brasílica* 10(2):199-212
- Media Cybernetics (2009) *Image pro-plus, 7.0 for windows*. Silver Spring
- Melo HC, Castro EM, Soares AM, Melo LA, Alves JD (2007) Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. *Hoehnea* 34(2):145-153
- Merida T (1970) Análisis de la productividad en cana de azúcar. IV Anatomia foliar de algunas variedades. *Turrialba* 20(30):307-310

- Metcalf CR (1960) *Anatomy of monocotyledons. I. Gramineae*. Clarendon Press, Oxford
- Paiva JGA, Fank-de-Carvalho SM, Magalhães MP, Graciano-Ribeiro D (2006) Verniz vitral 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasilica*, 20(2):257-264
- Pelegriñ CMG, Longhi-Wagner HM, Oliveira, PL (2009) Anatomia foliar como subsídio à taxonomia de espécies do Complexo *Briza* L. (Poaceae: Pooideae: Poeae). *Acta Botanica Brasilica*, 23(3): 666-680
- Piperno DR, Pearsal DM (1998) The silica bodies of tropical american grasses: morphology, taxonomy, and implications for grass systematics and fossil phytolith identification. *Smithsonian contributions to botany* 85. Smithsonian Institution Press, Washington
- Prychid CJ, Rudall PJ, Gregory M (2004) Systematics and biology of silica bodies in monocotyledons. *The Botanical Review*, 69(4):377-440
- Sánchez E, Montiel M, Espinoza AM (2003) Ultrastructural morphological description of the wild rice species *Oryza latifolia* (Poaceae) in Costa Rica. *Rev Biol Trop* 51(2):345-354
- Sánchez MG, Koch SD (1998) Estudio anatómico comparativo de la lamina foliar de *Eragrostis* (Poaceae: Chloridoideae) de México. *Acta Bo. Mex* 43:33-56.
- Santos AS, Desbies ALJ, Alvarez JM, Garcia JB, Sobrinho AAB (2010) Descritores epidérmicos de gramíneas (Poaceae) – um guia para identificação da dieta de herbívoros usando o programa Delta. Corumbá. Embrapa Pantanal, Boletim de pesquisa e desenvolvimento, Corumbá-MS
- Tateoka T, Inowe S, Kawano K (1959) Notes on some grasses IX: Systematic significance of bicellular microhairs of leaf epidermis. *Botanical Gazette* 121:80-91
- Ullah Z, Khan MA, Ahmad M, Zafar M, Ullah K (2011) Systematic implications of foliar epidermis in Andropogoneae (Poaceae) from Hindukush-himalayas Pakistan. *J Med Plants Res* 5(6): 949-957
- Watson L, Clifford HT, Dallwitz MJ (1985) The classification of Poaceae: Subfamilies and Supertribes. *Australian Journal of Botany* 33:433-484
- Watson L, Dallwitz MJ (1994) *The grass genera of the world*, 2nd. CAB International, Wallingford, Oxon, UK

Welker CAD, Longhi-Wagner HM (2012) The genera *Eriochrysis* P. Beauv., *Imperata* Cirillo and *Saccharum* L. (Poaceae – Andropogoneae – Saccharinae) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Biol.* 35:87-105

Tabela 1 Dados de coleta das populações de *S. villosum* estudadas

N	Município, Estado (coordenadas geográficas; altitude)	Data
178	Brasília, DF (15°56'29.6"S 47°53'21.1"W; 1117 m)	03/06/2009
179	Brasília, DF (15°55'7.46"S 47°54'0.90"W; 1121m)	03/06/2009
180	Cavalcante, GO (13°35'078"S 47°31'45.0"W; 813m)	23/07/2009
183	Cavalcante, GO (13°48'17.3"S 47°27'50.8"W; 790m)	24/07/2009
184	Cavalcante, GO (13°48'0.75"S 47°27'6.01"W; 807m)	24/07/2009
185	Teresina de Goiás, GO (13°48'3.80"S 47°15'8.08"W; 756m)	25/07/2009
186	Mambai, GO (14°29'0.26"S 46°06'0.12"W; 689m)	12/12/2009
190	Mambai, GO (14°33'0.51"S 46°06'0.36" W; 685m)	12/12/2009
199	Brasília, DF (15°46'0.49"S 47°58'0.35"W; 1093m)	18/12/2009
201	Brasília, DF (15°43'54.0"S 047°53'30.5"W; 1165m)	18/12/2009
202	Planaltina, DF (15°34'32.0"S 047°36'29.8"W; 1036m)	20/01/2010
209	Guapó, GO (16°51'12.1"S 49°35'32.1"W; 810m)	05/02/2010
210	Rio Verde, GO (17°52'21.5"S 50°57'48.9"W; 701m)	06/02/2010
212	Rio Verde, GO (18°09'53.0"S 51°05'54.2"W; 623m)	06/02/2010
214	Aparecida do Rio Doce, GO (18°14'37.3"S 51°16'02.8"W; 590m)	06/02/2010
215	Jataí, GO (18°06'04.2"S 51°29'25.0"W; 690m)	06/02/2010
218	Indiara, GO (17°12'21.2"S 50°06'00.9"W; 510m)	07/02/2010
219	Guapó, GO (16°49'01.5"S 49°31'51.6"W; 688m)	07/02/2010
226	Gramado, RS (29°21'40.9"S 50°51'11.4"W; 1013m)	19/12/2010
236	Alto Paraíso de Goiás, GO (14°08'12.1"S 47°42'57.3"W; 1208m)	14/02/2011
245	Guará, DF (15°49'58.4"S 47°57'53.3"W; 1047m)	24/02/2011
254	Mineiros, GO (18°15'32.0"S 52°53'22.3" W; 781m)	11/03/2011

(N) Populações listadas pelo número de coleta.

Tabela 2 Medidas das estruturas epidérmicas do colmo das populações de *S. villosum*

N	LC	Si	S	P	Mi	Ma
178	136.80±30.17	14.61±3.57	30.26±1.44	22.91±3.78	74.14±0.39	436.59±5.11
179	149.15±37.64	15.27±4.42	35.28±2.72	31.47±10.68	72.74±15.79	72.48±7.94
180	153.32±39.32	16.18±2.75	37.61±2.01	37.84±22.27	76.80±2.41	271.76±69.90
183	186.22±29.20	15.92±2.60	35.22±2.02	33.92±14.23	75.56±1.13	103.01±0.96
184	129.64±26.74	17.55±4.20	32.26±1.91	37.33±11.80	72.67±12.16	219.79±10.44
185	171.84±24.05	17.93±3.70	39.10±1.24	28.96±6.83	67.70±0.18	—
186	131.12±34.57	15.82±2.32	27.95±2.85	20.73±4.96	64.57±0.56	461.79±0.99
190	125.61±29.69	15.09±2.92	33.50±2.61	27.69±8.89	62.64±2.77	454.39±3.86
199	146.58±26.39	16.59±2.87	30.73±1.75	35.04±18.52	76.93±3.04	421.21±82.35
201	122.43±36.04	16.67±2.67	29.15±2.32	29.19±7.14	68.24±1.68	527.71±72.79
202	113.69±27.78	14.32±2.17	23.76±2.44	29.64±5.15	67.79±12.46	508.94±92.02
209	148.86±25.95	14.93±3.29	32.55±3.23	30.68±5.69	74.11±10.79	589.66±50.25
210	130.55±26.20	15.12±2.76	28.86±1.54	36.07±10.88	62.27±0.76	358.08±69.39
212	173.46±49.59	14.99±2.87	31.78±3.68	59.73±19.74 ^a	77.42±6.59	146.38±2.74
214	158.81±35.91	10.11±1.80 ^a	25.34±0.91	16.67±2.13	—	—
215	145.87±36.04	15.81±2.53	32.01±1.68	41.60±16.01	68.40±1.05	627.59±16.19
218	134.16±25.99	15.98±3.11	27.99±3.46	33.23±8.00	92.96±0.29 ^a	425.11±92.04
219	147.00±35.06	16.04±2.74	25.83±1.61	27.52±10.35	68.22±7.90	566.19±58.82
226	159.31±34.39	17.38±3.45	36.10±1.30	29.46±9.02	110.38±0.41 ^b	569.18±55.95
236	158.60±47.43	20.01±3.22	32.89±5.25	35.26±10.42	59.37±9.46	387.11±26.87
245	131.41±31.00	16.29±2.43	31.06±1.89	30.31±6.08	72.45±15.68	631.12±6.99
254	178.72±31.66	18.50±2.66	33.74±2.23	40.06±5.04	75.99±0.41	—

(N) Populações listadas pelo número de coleta. Valores expressos em média ± desvio-padrão das medidas. Números seguidos por letras, em uma mesma coluna, representam diferença significativa entre as populações. Comprimentos das células longas (LC), células silicificadas (Si), microtricomas (Mi), macrotricomas (Ma), espinhos (P) e estômatos (S) em µm

Tabela 3 Diversidade celular das estruturas epidérmicas em vista frontal do colmo de diferentes populações de *S. villosum*

N	Célula silicificada	Macrotricoma		Espinho	Célula subsidiária
		densidade	Base		
178	c, r	raros	1, m	p, h, lp	do, pl, i
179	c, d, r	raros	1	p, lp	do, pl, i
180	c, d, r	raros	1, 2	p, h, lp	do, pl, i
183	c, r	raros	1	p, h, lp	do, pl
184	c, r	raros	1, 2, m	p, h, lp	do, pl, i
185	c, r	-	-	p, h	do, pl
186	c, d, r	abundantes	1, m	p, h, lp	do, pl, i
190	c, r	abundantes	1, 2, m	p, h, lp	do, pl, i
199	c, d, r	abundantes	1, 2, m	p, h, lp	do, pl, i
201	c, r	raros	m	p, h, lp	do, pl, i
202	c, r	raros	1, 2	p	do, pl, i
209	c, r	abundantes	1, 2, m	p, h	do, pl, i
210	c, r	raros	1, 2	p, h, lp	do, pl, i
212	c, r	raros	1	p, h, lp	do, pl, i
214	c, r	-	-	p	do, pl, i
215	c, r	raros	1, 2, m	p, h, lp	do, pl, i
218	c, d, r	raros	1	p, h, lp	do, pl, i
219	c, r	abundantes	1	p, h, lp	do, pl, i
226	c, r	abundantes	1, 2, m	p, h, lp	do, pl, i
236	c, r	raros	1, m	p, h	do, pl, i
245	c, d, r	raros	1, m	p, h	do, pl, i
254	c, r	-	-	p, h	do, pl, i

(N) Populações listadas pelo número de coleta. Formato das células silicificadas: cruciforme (c), halteriforme (d) e retangular (r). Número de células na base dos macrotricomas: uma (1), duas (2) e várias (m). Tipos de espinhos: espinho (p), gancho (h) e espinhos longos (lp). Formato das células subsidiárias: em cúpula (do), plana (pl) e irregular (i)

Tabela 4 Medidas morfológicas e das estruturas anatômicas em secção transversal do colmo de diferentes populações de *S. villosum*

N	CW	D	L	T	Região Periférica			Região Intermediária			Região Central	
					Sc	V	P	Sc	V	P	V	P
178	0.40±0.01 ^a	0.90±0.08	31.00±5.59	198.8±13.17	0.67±0.03	0.12±0.01	0.20±0.01	—	0.10±0.01	0.89±0.09	0.23±0.01	0.76±0.01
179	0.32±0.03	0.91±0.08	30.96±5.50	198.88±13.04	0.67±0.02	0.14±0.01	0.17±0.01	0.12±0.01	0.14±0.01	0.73±0.08	0.24±0.01	0.75±0.01
180	0.18±0.02	0.99±0.08	32.56±4.30	251.36±7.42	0.60±0.01 ^a	0.15±0.01	0.24±0.01	—	0.17±0.01	0.83±0.08	0.23±0.01	0.76±0.01
183	0.190.01	0.55±0.05	34.84±3.04	253.36±4.65	0.85±0.03	0.08±0.01	0.06±0.01	0.12±0.01	0.11±0.01	0.76±0.09	0.23±0.01	0.77±0.01
184	0.28±0.03	0.99±0.08	33.96±3.12	253.64±5.17	0.86±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.13±0.01	0.07±0.01	0.80±0.01	0.24±0.01	0.75±0.01
185	0.28±0.03	0.84±0.05	33.96±2.84	253.4±4.48	0.84±0.01	0.10±0.01 ^a	0.05±0.01	0.40±0.01 ^a	0.18±0.01	0.41±0.01	0.23±0.01	0.76±0.01
186	0.25±0.04	0.80±0.08	34.24±2.74	221.6±35.08 ^a	0.49±0.02 ^b	0.15±0.01	0.35±0.01 ^a	0.02±0.01	0.12±0.01	0.85±0.01	0.24±0.01	0.75±0.01
190	0.21±0.021	0.60±0.08	40.12±1.86	299.6±8.41	0.69±0.03	0.15±0.01	0.14±0.01	0.06±0.01	0.11±0.01	0.83±0.01	0.22±0.01	0.77±0.01
199	0.16±0.02	0.552±0.05	28.52±4.64	150.4±8.41 ^b	0.80±0.01	0.12±0.01	0.07±0.01 ^b	0.11±0.01	0.10±0.01	0.77±0.01	0.20±0.01	0.79±0.01
201	0.17±0.04	0.64±0.10	47.45±6.73	275.4±12.25	0.74±0.01	0.15±0.01	0.10±0.02 ^c	0.08±0.01	0.12±0.01	0.79±0.01	0.21±0.01	0.78±0.01
202	0.11±0.01	0.60±0.13	41.48±10.75	257.2±23.17	0.56±0.01 ^c	0.17±0.03 ^b	0.25±0.01	0.07±0.01	0.15±0.01 ^a	0.78±0.01	0.21±0.01	0.78±0.01
209	0.16±0.04	0.55±0.05	48.16±2.67	304.84.20	0.71±0.03	0.12±0.02	0.17±0.01	0.12±0.01	0.09±0.01	0.80±0.01	0.20±0.00	0.79±0.01
210	0.19±0.01	0.59±0.08	50.08±1.63	349.6±8.42	0.52±0.02	0.15±0.01	0.33±0.01 ^d	0.46±0.01 ^b	0.13±0.01	0.40±0.01	0.20±0.00	0.79±0.01
212	0.26±0.04	0.89±0.10	31.00±5.59	250±8.16	0.72±0.01	0.06±0.01 ^c	0.21±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.84±0.01	0.20±0.01	0.80±0.01
214	0.18±0.01	0.65±0.11	50.04±1.59	350.4±8.51	0.34±0.01 ^d	0.16±0.01	0.49±0.02 ^e	0.02±0.00	0.18±0.01	0.80±0.01	0.22±0.01	0.77±0.01
215	0.19±0.01	0.54±0.05	31.00±5.59	260±8.16	0.79±0.03	0.15±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01 ^c	0.17±0.01	0.78±0.01	0.19±0.01	0.81±0.01
218	0.18±0.02	0.69±0.22	41.20±10.21	250±57.74	0.69±0.01	0.16±0.01	0.14±0.01	0.04±0.01	0.19±0.01 ^b	0.76±0.01	0.20±0.01	0.80±0.01
219	0.30±0.01	0.87±0.13	47.44±6.09	299.6±8.83	0.74±0.01	0.13±0.02	0.13±0.01 ^f	0.15±0.01 ^d	0.10±0.02	0.74±0.01	0.24±0.01	0.75±0.01
226	0.36±0.02 ^b	0.69±0.08	41.88±2.52	299.6±8.52	0.52±0.02	0.15±0.01	0.31±0.01 ^g	0.25±0.01 ^e	0.16±0.01	0.58±0.01 ^a	0.18±0.01	0.81±0.01
236	0.22±0.02	0.70±0.07	41.60±2.00	302.92±4.67	0.63±0.03 ^e	0.14±0.01 ^d	0.23±0.01	0.07±0.01	0.18±0.01	0.75±0.01	0.19±0.01	0.81±0.01
245	0.16±0.03	0.57±0.11	103.4±1.78	361.24±39.44	0.73±0.02	0.12±0.02	0.15±0.01	0.18±0.01 ^f	0.13±0.01	0.68±0.01	0.19±0.01	0.81±0.01
254	0.12±0.01	0.55±0.05	29.60±5.60	195.2±11.22	0.70±0.03	0.15±0.01	0.14±0.01	0.01±0.00	0.17±0.01	0.81±0.01	0.20±0.01	0.80±0.00

(N) Populações listadas pelo número de coleta. Valores expressos em média ± desvio-padrão das medidas. Números seguidos por letras, em uma mesma coluna, representam diferença significativa entre as populações. Espessura da parede do colmo (CW), diâmetro do entrenó (D), comprimento do entrenó (L) e comprimento total do colmo (T) em cm. Proporções de esclerênquima (Sc), tecido vascular (V) e parênquima (P).

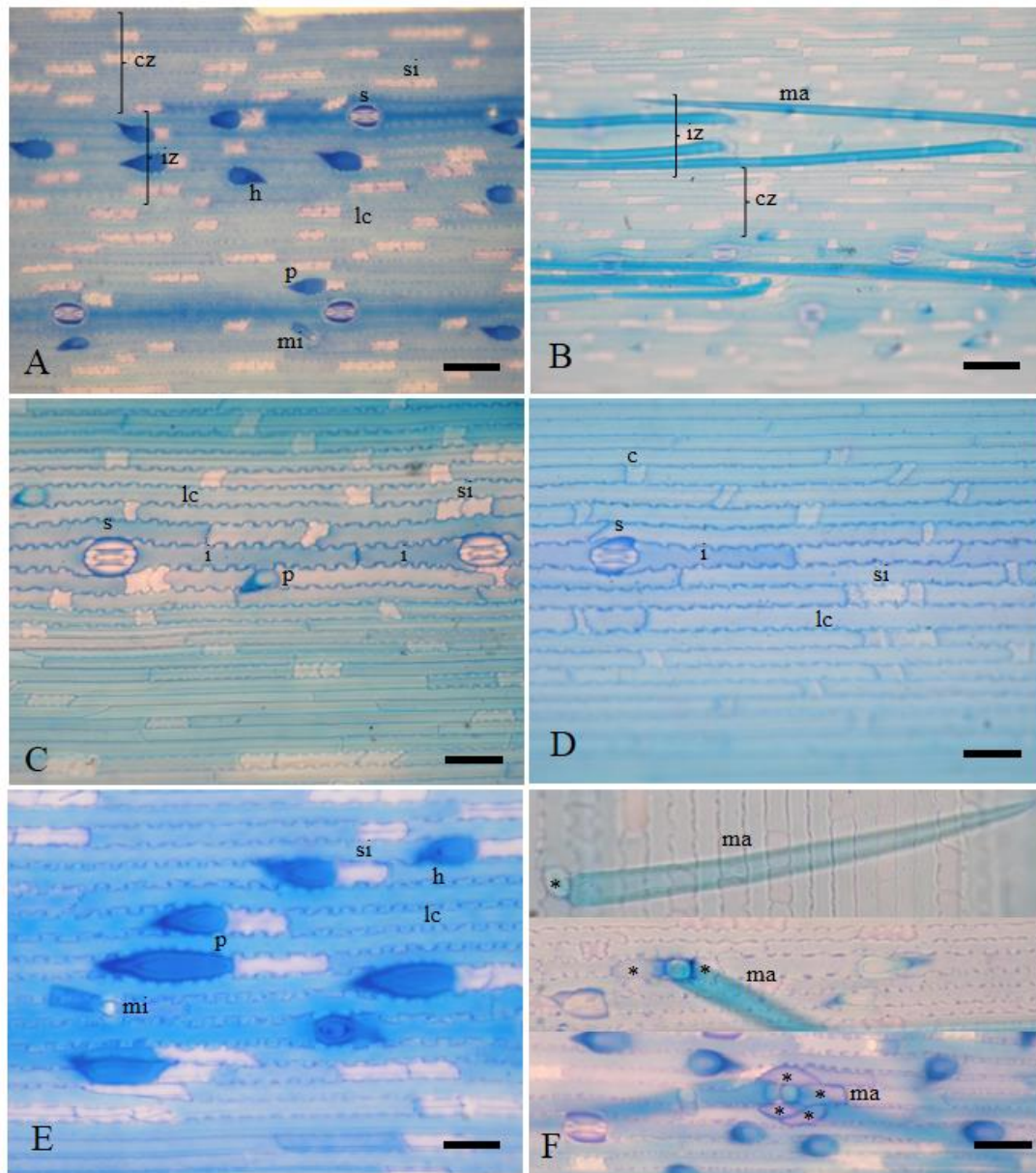


Fig. 1 Vista frontal da epiderme do colmo de diferentes populações de *S. villosum*. a 179. b 226. c 186. d 214. e 219. f 184. Notam-se os diferentes tipos celulares, com tamanhos e frequência distintos, complexos estomáticos e tricomas restritos à zona intercostal, além de quantidades distintas de células na base dos macrotricomas. c célula suberosa, cz zona costal, h gancho, i célula interestomática, iz zona intercostal, lc célula longa, ma macrotricoma, mi microtricoma, p espinho, s complexo estomático, si célula silicificada, * células na base dos macrotricomas. Barra 28 μm em a-b; 15 μm em c-f.

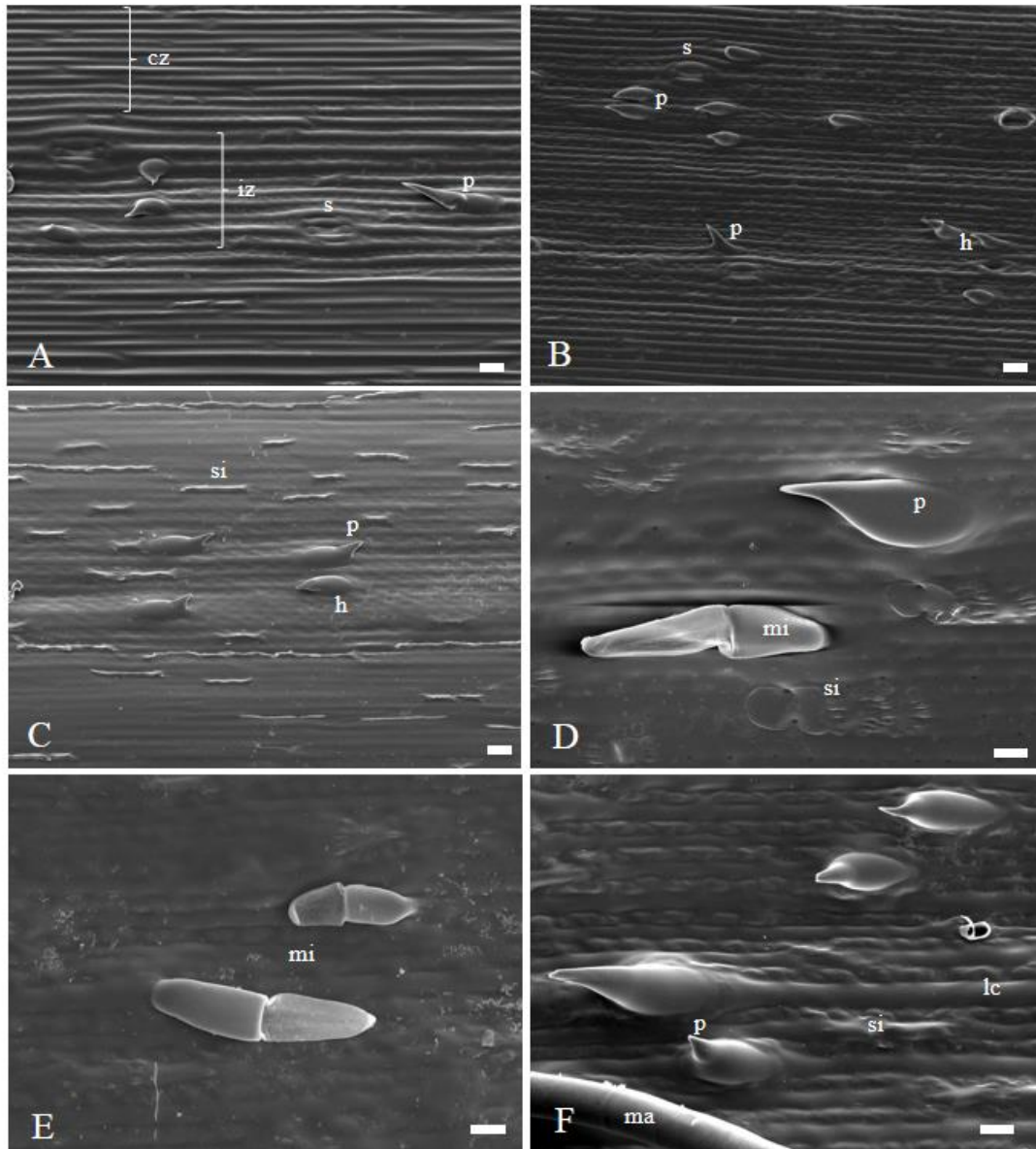


Fig. 2 Epiderme do colmo de diferentes populações de *S. villosum* sob microscopia eletrônica de varredura. a 183. b 190. c 254. d 180. e 185. f 201. Ocorrem células curtas distribuídas de forma não padronizada, microtricomas de tamanhos distintos e diversidade morfológica dos espinhos e células silicificadas. cz zona costal, h gancho, iz zona intercostal, lc célula longa, ma macrotricoma, mi microtricoma, p espinho, s complexo estomático, si célula silicificada. Barra 10 µm.

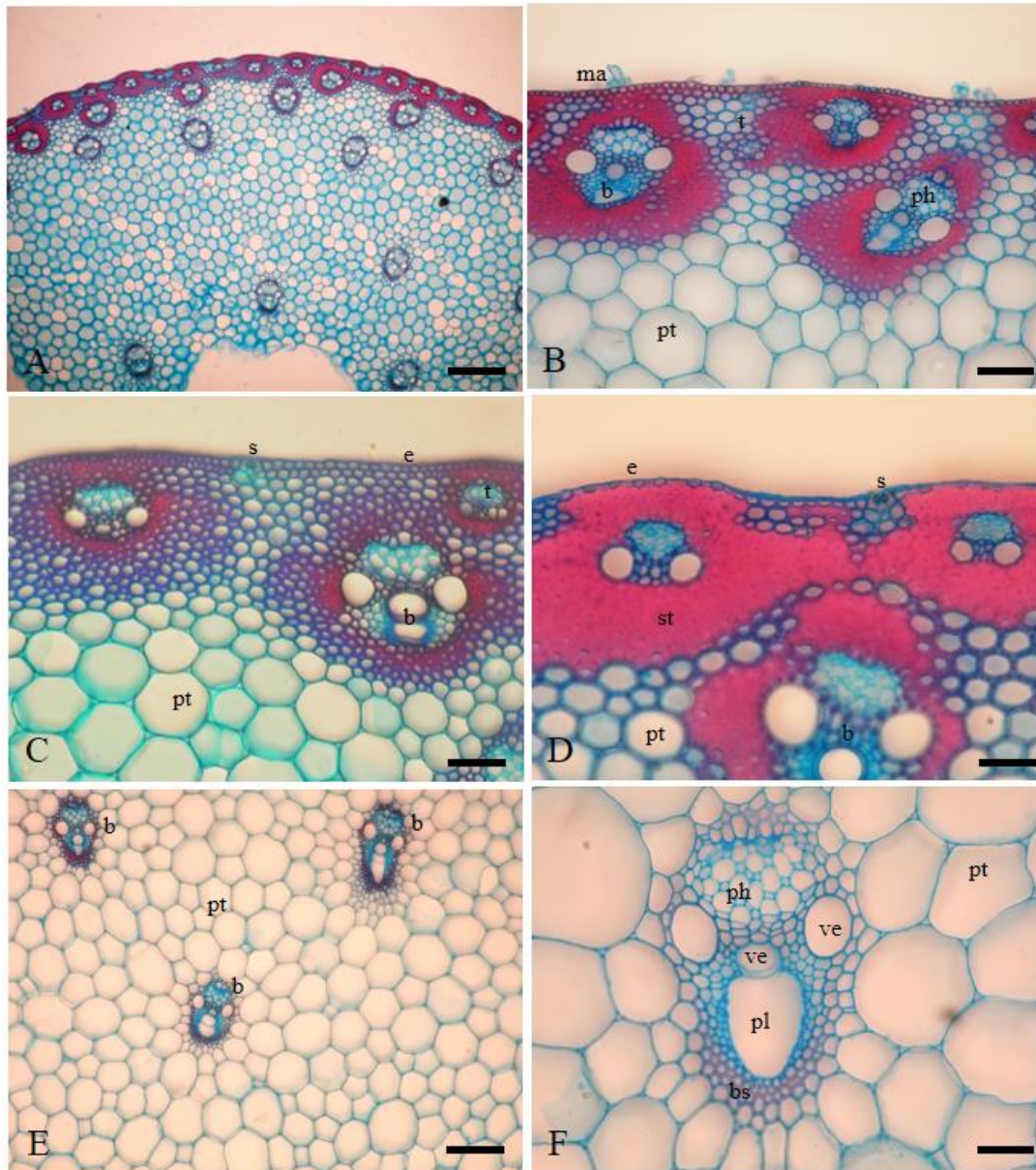


Fig. 3 Secções transversais do colmo de diferentes populações de *S. villosum*. a aspecto geral de 236. b detalhe da periferia de 226. c detalhe da periferia de 212. d detalhe da periferia de 245. e feixes centrais de 215. f detalhe do feixe central de 226. Observa-se epiderme uniestratificada, diferentes proporções de parênquima e esclerênquima no córtex e feixes vasculares revestidos por bainha única. b feixe vascular, bs bainha de feixe, e epiderme, ma macrotricoma, ph floema, pl lacuna do protoxilema, pt tecido parenquimático, s complexo estomático, st tecido esclerenquimático, t traço foliar, ve elemento de vaso. Barra 150 μm em a, e; 67 μm em b, c; 28 μm em d, f.

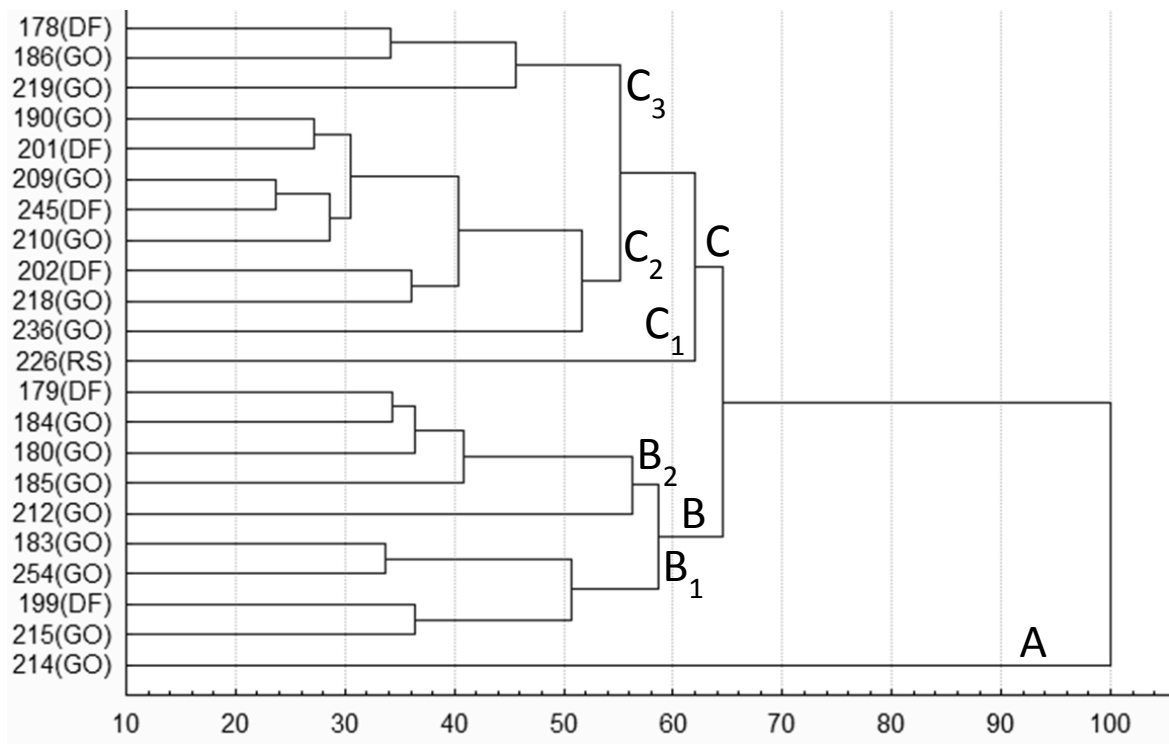


Fig. 4 Dendrograma gerado a partir da análise de agrupamento das médias padronizadas das variáveis das populações de *S. villosum*, a medida de similaridade entre as populações foi “linkage distance” e o algoritmo foi UPGMA. Principais grupos: A ausência de microtricomas; B menores comprimentos total e dos entrenós, associado a menores comprimentos ou ausência dos macrotricomas; B₁ menor diâmetro dos entrenós; B₂ maior diâmetro dos entrenós; C maiores comprimentos total, dos entrenós e dos macrotricomas; C₁ maiores células longas, complexos estomáticos e microtricomas; C₂ maiores comprimentos dos entrenós e espinhos, associado a menores diâmetros e espessura da parede dos entrenós; C₃ menores espinhos e maiores diâmetros dos entrenós.

6. CAPÍTULO 2*

*Para este capítulo seguiram-se as normas do periódico *Acta Botanica Brasilica*.

Silvia Dias da Costa Fernandes

Caracterização estrutural do colmo das espécies brasileiras de *Saccharum* L. (Poaceae)

RESUMO

(Caracterização estrutural do colmo das espécies brasileiras de *Saccharum* L. (Poaceae)). No Brasil ocorrem três espécies nativas de *Saccharum* (Poaceae) - *S. angustifolium* (Nees) Trin., *S. asperum* (Nees) Steud. e *S. villosum* Steud., mas as informações sobre elas são escassas e a identificação baseada nas inflorescências e lâminas foliares, estruturas que nem sempre estão presentes ou portando as características diagnósticas. A anatomia pode ser uma ferramenta para subsidiar a taxonomia das gramíneas, para as espécies supracitadas há poucos estudos anatômicos, e estes não apresentam fins taxonômicos. O objetivo deste trabalho foi descrever a estrutura externa e a anatomia do colmo das três espécies brasileiras de *Saccharum*, além de uma provável espécie nova, verificar possíveis caracteres diagnósticos em nível específico e proporcionar um melhor conhecimento acerca do gênero. Foram analisados fragmentos da epiderme em microscopia óptica e eletrônica de varredura, além de secções transversais do colmo. *Saccharum asperum* possui células comuns longas maiores, enquanto as células silicificadas, espinhos, microtricomas e macrotricomas são menores e significativamente diferentes das demais espécies. Os maiores microtricomas estão presentes em *S. angustifolium*. *Saccharum villosum* apresentou a maior diversidade em termos anatômicos. As principais diferenças da provável espécie nova em relação às demais já descritas estão relacionadas a maiores complexos estomáticos, comprimento total e espessura da parede do colmo e comprimento dos 2º e 3º entrenós.

Palavras-chave: anatomia, caule, Gramineae

Introdução

Poaceae, uma das maiores famílias botânicas, é composta por 12 subfamílias, uma das principais é Panicoideae, atualmente formada por duas grandes tribos, Sacchareae e Paniceae, além de outras dez tribos com menor número de representantes (Soreng *et al.*, 2013). Ahmad *et al.* (2010) citam que Sacchareae é cosmopolita, comporta 11 subtribos distintas principalmente via caracteres das inflorescências e seus cerca de 87 gêneros não estão claramente delimitados. Nesta tribo encontra-se a

subtribo Saccharinae, que inclui cerca de 140 espécies distribuídas em 13 gêneros, entre estes, *Saccharum* L. (Clayton & Renvoize 1986).

Saccharum apresenta grande importância econômica, mas do ponto de vista taxonômico ainda há controvérsias sobre sua circunscrição (Welker & Longhi-Wagner 2012). Em seu sentido amplo, incluindo as espécies de *Erianthus* Michx., compreende cerca de 40 espécies (Clayton & Renvoize 1986). Entretanto, alguns autores consideram *Erianthus* distinto de *Saccharum*, tendo este aproximadamente 28 espécies (Watson & Dallwitz 1992). A análise filogenética realizada por Hodkinson *et al.* (2002) não encontrou justificativa para esta divisão, mas esses autores incluíram poucas espécies de *Erianthus*. Desta maneira, como não há estudos conclusivos, *Saccharum* será aceito aqui em seu sentido amplo, conforme adotado por Filgueiras (2003).

No Brasil ocorrem 3 espécies nativas de *Saccharum* – *S. angustifolium* (Nees) Trin. que ocorre nas regiões Sudeste e Sul, *S. asperum* (Nees) Steud. encontrada da região Centro-oeste a Sul e *S. villosum* Steud., com maior distribuição, presente desde a região Nordeste a Sul (Filgueiras & Welker 2013). Porém, as informações sobre estas espécies são escassas, normalmente estão presentes apenas em levantamentos florísticos (Cheavegatti-Gianotto *et al.* 2011).

As gramíneas são comumente identificadas com base em seus caracteres florais, o que pode constituir um problema, já que a inflorescência não persiste por um grande período do ciclo de vida desses indivíduos. Para *Saccharum*, além das inflorescências, a morfologia e a pilosidade das lâminas foliares também apresentam importância taxonômica (Welker & Longhi-Wagner 2012), entretanto, durante alguns períodos as folhas ficam secas, não mantendo suas características. Assim, a utilização da anatomia como subsídio para a taxonomia pode tornar possível o reconhecimento do táxon quando as estruturas reprodutivas não estão disponíveis (Metcalf 1960), além de que algumas estruturas anatômicas são usualmente constantes, podendo ser mais confiáveis do que os caracteres da morfologia externa (Watson *et al.* 1985).

Os estudos anatômicos dos órgãos vegetativos de *Saccharum* são relativamente escassos, os mais frequentes abordam a lâmina foliar de cultivares de cana-de-açúcar e não apresentam fins taxonômicos (Artschwager 1925; Metcalfe 1960; Merida 1970; Ferreira *et al.* 2005; 2007; García & Jáuregui 2008). Desta forma, este trabalho tem como objetivo descrever a estrutura externa e a anatomia do colmo das três espécies brasileiras do gênero *Saccharum*, além de uma provável espécie nova, verificar

possíveis caracteres diagnósticos em nível específico e proporcionar um melhor conhecimento acerca do gênero.

Material e métodos

Foram analisados 3 colmos de cada uma das 35 populações (4 de *S. angustifolium*, 8 de *S. asperum*, 22 de *S. villosum* e 1 de *S. sp*) encontradas em diferentes localidades brasileiras, identificadas pelos respectivos números de coleta e depositadas nos herbários da Universidade de Brasília – UB ou da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - ICN (Tab. 1). As amostras coletadas das regiões medianas dos 2º e 3º entrenós (contados a partir da inflorescência) foram preservadas em álcool etílico 70% para análise anatômica, já as amostras, da mesma região dos entrenós, obtidas de material herborizado, foram previamente reidratadas para posterior preservação em álcool etílico 70%.

Foram medidos o comprimento total do colmo, diâmetro, espessura da parede e comprimento dos 2º e 3º entrenós. Os fragmentos da epiderme foram obtidos com solução de Franklin (Kraus & Arduin 1997) a 60°C e corados com azul de metileno e bórax (1% aquoso, Langeron 1949). As secções transversais foram realizadas à mão livre em micrótomo de mesa, clarificadas com solução de hipoclorito de sódio (50% aquosa, Kraus & Arduin 1997) e coradas com safranina e azul de alciano (1% aquosos, Luque *et al.* 1996). Ambas as secções foram desidratadas em série etílica, diafanizadas em acetato de butila e montadas entre lâmina e lamínula em resina sintética (Paiva *et al.* 2006).

Para complementar a análise anatômica foram observados caracteres micromorfológicos. As amostras foram desidratadas em série acetônica crescente até a saturação, secas ao ponto crítico, montadas em porta espécimen, cobertas com ouro ou grafite, e examinadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-7001F.

Os caracteres analisados foram os indicados no roteiro desenvolvido por Graciano-Ribeiro *et al.* (2006) e a terminologia utilizada seguiu Ellis (1976; 1979). As fotomicrografias foram obtidas com auxílio do microscópio Olympus CX 31 acoplado à máquina digital. Para cada população, em vista frontal da epiderme, foram tomadas 25 medidas dos comprimentos das células longas, silicificadas, tricomas e complexos estomáticos. Nas secções transversais foram quantificadas as proporções de tecidos parenquimático, esclerenquimático e vascular de 3 campos distintos de cada uma das

regiões do sistema vascular: periférica, intermediária e central. Todas essas medidas foram tomadas com o auxílio do programa de análise de imagens Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics 2009).

A determinação das diferenças das populações, para todas as variáveis estudadas, foi realizada por análise de variância (ANOVA) e comparação das médias com pós-teste Tukey modificado para número desigual de repetições (*Unequal N HSD*), assumindo probabilidade de erro de 5% ($p < 0.05$). A fim de detectar o grau de similaridade entre as populações, foi realizada análise de agrupamento com as médias padronizadas das variáveis da epiderme, comprimento total do colmo e espessura da parede e comprimento dos 2º e 3º entrenós, para as estruturas inexistentes em algumas populações foi atribuído valor zero, foi utilizada a técnica de ligação de média de grupos (UPGMA) e a medida de similaridade foi “linkage distance”, transformada para porcentagem, o resultado desta análise foi apresentado na forma de dendograma. Todas essas análises foram feitas com auxílio do programa Statistica 8.0 (Hill & Lewicki 2007).

Resultados

A epiderme caulinar é composta por células comuns longas, curtas dos tipos silicificadas e suberosas, complexos estomáticos e, frequentemente, tricomas. Algumas populações de *S. asperum* (312, 10673, 10683 e 10696) carecem de tricomas, nas demais espécies essas estruturas epidérmicas estão presentes em diferentes morfologias, comprimentos e densidades (Tab. 2 e Fig. 1 - 3). É possível caracterizar duas zonas distintas - costal e intercostal. Em ambas as zonas ocorrem células comuns longas, curtas dos tipos silicificadas e suberosas. Complexos estomáticos e tricomas estão restritos à zona intercostal. As células epidérmicas costais apresentam menor grau de sinuosidade das paredes quando comparadas às intercostais (Fig. 1A - C).

As células longas apresentam formatos homogêneos e tamanhos distintos, suas paredes celulares não são espessadas e as sinuosidades das paredes são irregulares (Tab. 2 e Fig. 1 - 2). As células curtas, complexos estomáticos e tricomas estão presentes entre as células longas de uma mesma fileira, de forma não padronizada (Fig. 1 - 2). As células curtas podem estar solitárias ou em conjunto de até 5 células, cada conjunto comporta apenas células silicificadas ou célula silicificada com suberosa e/ou tricoma (Fig. 2A - D).

As células silicificadas apresentam superfície crenada, principalmente nas paredes anticlinais verticais, e os formatos variados: retangular estreito a largo, cruciforme, e, menos frequente, halteriforme com superfície lisa (Fig. 3C - E). As células silicificadas halteriformes apresentam disposição paralela em relação às células longas (Fig. 3E), mas em algumas populações de *S. asperum* (312, 10673 e 10683), essas células podem estar dispostas perpendicularmente (Fig. 3D). As células suberosas são raras, apresentam formato quadrado e podem estar isoladas entre duas longas ou formar o par sílico-suberoso (Fig. 2B).

Os complexos estomáticos apresentam a forma de cúpula das células subsidiárias como a mais comum, mas também podem apresentar paredes horizontais retas ou forma irregular na mesma população (Fig. 1C - F). Independentemente da espécie, os complexos estomáticos apresentam distribuição não padronizada ao longo de toda zona intercostal e são caracterizados pela deposição de sílica nas células-guarda e subsidiárias (Fig. 1E - F e 2B - C). As células interestomáticas são semelhantes às células longas intercostais, mas apresentam as extremidades de suas paredes côncavas, encaixando ao redor do complexo estomático (Fig. 1B e 2C).

Os tricomas são as estruturas epidérmicas que mostraram maior diversidade entre as populações nas diferentes espécies, quando presentes, apresentam tamanhos variados e podem ser microtricomas, macrotricomas ou do tipo espinho (Fig. 1 - 3 e Tab. 2). Os microtricomas são do tipo eupanicoide, apresentam tamanhos variados (Tab. 2), mas as células basal e distal têm aproximadamente o mesmo comprimento, ocorrem entre duas células longas ou entre célula longa e interestomática, a inserção da célula basal é em forma de círculo, a célula distal tem formato de bastão e devido à sua parede delgada, essa célula é frequentemente perdida durante a preparação histológica (Fig. 1E - F e 2A). Em *S. angustifolium* esses tricomas estão sempre presentes, em *S. villosum* apenas uma população (214) não possui e em *S. asperum* a maioria das populações (295, 312, 10673, 10683 e 10696) carece deste tipo de tricoma (Fig. 1C - D e 2B - C).

Os macrotricomas apresentam tamanhos e densidades variados; podem apresentar uma, duas ou várias células associadas à base (Fig. 1B, 1F, 3A e 3F). Em *S. angustifolium* esses tricomas estão presentes na metade das populações (227 e 279), ocorrendo em baixa frequência e em diferentes tamanhos (Tab. 2), apenas com uma célula na base. Em *S. asperum* podem ser frequentes, mas ocorrem em poucas populações (280 e 316) com diferentes números de células na base. *Saccharum villosum*

é a espécie mais versátil em termos de macrotricomas, mas estão ausentes em três populações (185, 214 e 254).

Os espinhos são o tipo de tricoma mais frequente nas diferentes populações das espécies brasileiras de *Saccharum* (Fig. 1A e 2D), no sentido amplo do termo são estruturas pontiagudas com base elíptica a arredondada, apresentam deposição de sílica no ápice e diferentes tamanhos (Tab. 2, Fig. 3C e 3E), quanto à forma podem ser classificados em espinhos e ganchos, sendo que os ganchos apresentam ápice curvo e são geralmente menores que os espinhos, apenas *S. angustifolium* é desprovida de ganchos, nas demais espécies este tipo celular está presente em algumas populações. Todas as populações de *S. angustifolium* e *S. villosum* apresentam espinhos propriamente ditos, em *S. asperum* eles estão presentes na metade das populações (260, 280, 295 e 316).

Os comprimentos das células epidérmicas das espécies de *Saccharum* analisadas foram distintos. Com exceção das células comuns longas, *S. asperum* é a espécie que apresenta as menores células epidérmicas; espinhos e microtricomas são maiores em *S. angustifolium*; *S. villosum* apresenta os maiores macrotricomas e *S. sp.*, os maiores complexos estomáticos (Tab. 2).

Os colmos são circulares, ocos na porção mediana do entrenó e maciços nas regiões próximas aos nós, o comprimento total e o comprimento e a espessura da parede dos entrenós variam entre as espécies (Tab. 3). Em secção transversal observa-se epiderme, córtex e sistema vascular (Fig. 4). A superfície pode ser lisa ou apresentar saliências na zona costal e reentrâncias na zona intercostal (Fig. 4B - D).

A epiderme é uniestratificada, recoberta por cutícula lisa e delgada, sendo constituída pelos tipos celulares já descritos na vista frontal. As células epidérmicas comuns têm formato arredondado a quadrado, paredes espessadas e lignificadas, na zona costal essas células apresentam menor volume, tanto que eventualmente não é possível visualizar o lúmen celular (Fig. 4D). As células silicificadas são retangulares e com volume similar às epidérmicas comuns. Os complexos estomáticos são nivelados em relação às demais células epidérmicas, podendo ocorrer pequena cavidade subestomática (Fig. 4D).

O córtex possui cerca de 3 camadas celulares, com diferentes proporções de parênquima e esclerênquima, mesmo dentro da mesma espécie (Fig. 4B - C). Nos espécimes com mais esclerênquima, o parênquima está organizado em pequenos grupos

adjacentes à zona intercostal (Fig. 4C – D). Nos espécimes que ocorre mais parênquima, ocorrem calotas de esclerênquima nos traços foliares e feixes vasculares periféricos (Fig. 4A - B).

O sistema vascular é do tipo atactostelo, formado por traços foliares e feixes vasculares colaterais imersos, aleatoriamente, em tecido parenquimático (Fig. 4A). Os traços foliares são circundados por esclerênquima, podendo haver conexão com o esclerênquima do feixe vascular adjacente, normalmente apresentam dois elementos de vaso do metaxilema e carecem de lacuna do protoxilema, podem ocorrer traços foliares apenas com tecido floemático sendo constituídos por elementos de tubo crivado e células companheiras (Fig. 4B - D).

Da região periférica em direção à central a densidade dos feixes vasculares e o espessamento das paredes das células circundantes diminuem, enquanto o tamanho dos feixes vasculares e o volume das células parenquimáticas onde estão imersos aumentam. Os feixes vasculares periféricos têm formato circular e os centrais são alongados (Fig. 4). A bainha dos feixes vasculares é única, formada por células esclerenquimáticas e parenquimáticas, a proporção esclerênquima/parênquima é menor nos feixes centrais (Fig. 4F). Em todo o sistema vascular, a maioria dos feixes vasculares apresenta lacuna, elemento de vaso do protoxilema e 2 elementos de vaso do metaxilema, raramente ocorrem 3, sendo 2 geminados (Fig. 4F).

As proporções de tecidos nas diferentes regiões do sistema vascular também foram distintas entre as espécies de *Saccharum* analisadas. Na região periférica, *S. angustifolium* possui maior proporção de fibras e, conseqüentemente, menor proporção de tecido vascular. Na região intermediária, além de *S. angustifolium*, *S. asperum*, também apresenta grande proporção de fibras, e nessas espécies as proporções de parênquima são as menores. Na região central de todas as espécies não há fibras, em *S. villosum* ocorre a menor proporção de parênquima e, conseqüentemente maior de tecido vascular (Tab. 3). Não há uma medula característica, os feixes vasculares encontram-se distribuídos até a região central do colmo, em algumas populações esta região é fistulosa (Fig. 4E).

As medidas do comprimento total do colmo e espessura da parede e comprimento dos 2º e 3º entrenós são as mais divergentes entre as espécies de *Saccharum* analisadas (Tab. 3), inclusive foram as responsáveis pela provável espécie nova (*S. sp*) estar em um ramo distinto de todas as outras espécies no dendograma (Fig.

5). Os comprimentos dos 2º e 3º entrenós são significativamente diferentes em todas as espécies, a parede e o comprimento total do colmo são muito maiores em *S. sp* (Tab. 3).

A análise de agrupamento permitiu categorizar as diferentes espécies de *Saccharum* analisadas baseado em suas similaridades (Fig. 5). O ramo A é constituído apenas pela provável espécie nova (*S. sp*), uma vez que é a que apresenta as maiores medidas morfológicas do colmo, além de possuir os maiores complexos estomáticos.

O segundo ramo é composto por todas as outras populações, sendo dividido em 2 grupos (B e C). O grupo B é constituído pela maioria das populações de *S. asperum* oriundas da região sul do Brasil e por um espécime de *S. villosum* de Goiás (214), destituído de micro e macrotricomas, assim como os espécimes de *S. asperum* do grupo.

O grupo C abrange as populações que possuem microtricomas, ou seja, todas as populações de *S. angustifolium*, a maioria de *S. villosum*, uma população de *S. asperum* do Rio Grande do Sul (280) e as demais populações desta espécie, oriundas de Minas Gerais e do Distrito Federal (260 e 316). Este grupo, por possuir o maior número de ramos, foi subdividido em C₁ e C₂, ambos grupos com representantes de *S. villosum*. Em C₁ encontram-se as populações com os maiores complexos estomáticos e menores macrotricomas, além de *S. villosum*, também há todas as populações de *S. angustifolium* e algumas de *S. asperum* (280). Em C₂ ocorrem apenas as populações de *S. villosum*, portadoras dos menores complexos estomáticos e maiores macrotricomas.

Discussão

Apesar da alta diversidade anatômica nas espécies brasileiras de *Saccharum*, algumas estruturas estão sempre presentes nos colmos, como epiderme diferenciada em zonas costal e intercostal, células comuns longas com paredes sinuosas, células silicificadas com superfície crenada e formatos cruciforme e retangular, complexos estomáticos nivelados em relação às demais células epidérmicas e com células subsidiárias em cúpula e planas, células suberosas quadradas, córtex com parênquima e esclerênquima, e feixes vasculares revestidos por bainha única. Para Watson *et al.* (1985) paredes sinuosas é uma característica de *Saccharaeae* e Metcalfé (1960) relata o formato cruciforme das células silicificadas para *Saccharum*.

Nas espécies brasileiras de *Saccharum* foram encontradas diferenças no comprimento das estruturas epidérmicas (Tab. 2), o que explica parte dos grupos gerados no dendograma (Fig. 5). *Saccharum asperum* possui células comuns longas

maiores, enquanto as células silicificadas, espinhos, microtricomias e macrotricomias são menores e significativamente diferentes das demais espécies (Tab. 2). Hefler & Longhi-Wagner (2010) também utilizaram dimensão das células epidérmicas para separar espécies de *Cyperus* L. subg. *Cyperus*, apesar destas autoras terem analisado a lâmina foliar, vários tipos celulares que apresentaram diferenças foram os mesmos do colmo de *Saccharum*.

O formato das células epidérmicas longas é uniforme (Fig. 1 - 2), o que está de acordo com Ellis (1979), que afirma que são as células curtas as que mais sofrem diferenciação e podem apresentar distinções nas comparações intra e interespecíficas. As células curtas costais das espécies de *Saccharum* têm menor grau de sinuosidade das paredes que as intercostais, e podem estar tanto isoladas quanto em pares, como os sílico-suberosos, conforme descrito por Evert (2006) e Ullah *et al.* (2011). No entanto, não houve formato padrão para as células silicificadas entre as espécies de *Saccharum*, todas podem apresentar os formatos retangular estreito a largo, cruciforme e halteriforme com superfície lisa, a única distinção é que em *S. asperum* essas células podem estar dispostas perpendicularmente à epiderme, enquanto nas demais ocorrem paralelamente (Fig. 3C - E).

Os complexos estomáticos de todas as espécies de *Saccharum* analisadas são paracíticos, com células-guarda halteriformes e estão restritos à zona intercostal, conforme descrito por Metcalfe (1960) para a família, mas diferentemente do que ocorre nas lâminas foliares, não há fileiras contínuas de complexos estomáticos, sendo a distribuição irregular. Apesar de Ellis (1986) destacar que em lâminas foliares de Panicoideae os principais tipos de células subsidiárias apresentam o formato triangular e em cúpula, no colmo das espécies de *Saccharum* não foram observadas células triangulares, mas em cúpula, plana ou irregular, mas os diferentes formatos podem coexistir em uma mesma espécie, resultado também observado por Ellis (1979). Em relação ao tamanho, os complexos estomáticos de todas as espécies de *Saccharum* são considerados pequenos (< 90 µm, Santos *et al.* 2010), corroborando os valores 28-45 µm encontrados por Watson & Dallwitz (1994) e Ullah *et al.* (2011) para o gênero, sendo que os maiores estão presentes em *S. sp.*

Os tricomas são as estruturas epidérmicas que mostraram maior diversidade entre as populações nas diferentes espécies, mas não houve padrão dessas células para distinção das espécies, em *S. asperum* há populações que portam todos os tipos de

tricomas (280 e 316) e outras que não apresentam nenhum tipo (312, 10673, 10683 e 10696). Em relação aos microtricomas, estão sempre presentes em *S. angustifolium* e em maior tamanho (Tab. 2), em *S. villosum* apenas uma população (214) não possui e em *S. asperum* não ocorrem nas populações oriundas da região sul do Brasil (Fig. 1C – D e 2B - C), nas demais populações estão presentes, mas apresentam o menor tamanho (Tab. 2). Watson & Dallwitz (1994) citam que em Panicoideae os microtricomas estão sempre presentes, esta afirmação pode estar correta para as lâminas foliares, mas não para os colmos, uma vez que foram encontradas várias populações de *Saccharum* que não portam microtricomas. Quanto à localização desses tricomas, Santos *et al.* (2010) citam que em Poaceae a maioria ocorre na zona intercostal, para as populações de *Saccharum*, todos os tipos de tricomas ocorrem apenas na zona intercostal.

Os macrotricomas também são distintos nas populações, sem apresentar um padrão entre as espécies. Em *S. angustifolium* e *S. asperum*, quando presentes, são os menores em relação às demais espécies (Tab. 2), sendo que em *S. angustifolium* ocorre apenas uma célula na base. Em *S. asperum*, *S. villosum* e *S. sp* há diferentes números de células na base. *Saccharum villosum* é a espécie mais versátil em termos de tamanho e densidade, podendo também estar ausentes em algumas populações (185, 214 e 254). Segundo Melo *et al.* (2007), a epiderme é um tecido bastante responsivo às alterações ambientais, tanto que Aliscioni (2000) analisando populações de *Paspalum* L., outro gênero de Poaceae, verificou que algumas espécies crescem em uma ampla diversidade de habitats, apresentando grande adaptação ecológica, principalmente em relação comprimento, frequência e tipo de base dos macrotricomas, o que pode estar ocorrendo com *S. villosum*, já que é a espécie brasileira de *Saccharum* encontrada em um maior número de regiões.

Os espinhos, no sentido amplo do termo, são o tipo de tricoma mais frequente, estando ausentes apenas em algumas populações de *S. asperum* (312, 10673, 10683 e 10696), nas demais populações desta espécie, ocorrem com o menor comprimento (Tab. 2). Os ápices dos espinhos de *Saccharum* são voltados para direções distintas (Fig. 1A), diferente do relatado para lâminas foliares de Poaceae por Metcalfe (1960) e Ellis (1979), que são geralmente voltados para mesma direção. Ellis (1979) e Ullah *et al.* (2010) citam que a presença e distribuição dos espinhos podem ser importantes para identificação e diferenciação das espécies. Outras espécies da mesma família também

apresentam populações com variações no tamanho e densidade dos espinhos, como *Oryza latifolia* Desv. (Sánchez et al. 2003).

Nenhuma medida das variáveis epidérmicas de *S. villosum* mostrou diferença significativa em relação às demais espécies (Tab. 2). Welker & Longhi-Wagner (2012) citam que *S. villosum* apresenta grande variabilidade morfológica, que pode ser devido a mais de uma espécie estar envolvida dentro da sua atual descrição. Já Hodkinson *et al.* (2002) citam que a taxonomia do “complexo *Saccharum*” é confusa, uma vez que podem ocorrer híbridos interespecíficos e intergenéricos. Desta maneira, é possível que, além da formação de híbridos naturais entre *S. villosum* e *S. angustifolium* (Welker & Longhi-Wagner 2012), ocorra também entre *S. villosum* e *S. asperum*, justificando a quantidade de características em comum nestas espécies uma vez que estas estão sujeitas às mesmas condições ambientais e distribuição (Filgueiras & Welker 2013) e a disposição das populações no dendograma, estando *S. villosum* dentro de grupos de *S. angustifolium* e *S. asperum* (Fig. 5).

Em secção transversal os colmos são circulares e compreendem epiderme, córtex e sistema vascular, padrão encontrado em diversas Poaceae (Metcalfé 1960; Jacobsen *et al.* 1992; Evert 2006). O córtex é delimitado por esclerênquima associado a traços foliares e feixes vasculares, segundo Evert (2006), a distribuição do esclerênquima associado aos feixes vasculares pode estar relacionada com fatores ambientais, gramíneas de ambientes áridos são caracterizadas por esclerênquima desenvolvido. No entanto, Welker & Longhi-Wagner (2012) comentam que *S. villosum* tem preferência por ambientes úmidos, e várias populações de *S. angustifolium* e *S. asperum* também foram coletadas em solo úmido, o que demonstra que as alterações no genótipo têm maior influência que os fatores ambientais na determinação da quantidade de esclerênquima.

No sistema vascular os feixes vasculares estão imersos, aleatoriamente, em tecido parenquimático, sendo que da região periférica em direção à central a densidade dos feixes vasculares diminui e o tamanho dos feixes vasculares e o volume das células parenquimáticas aumentam (Fig. 4A). A bainha dos feixes vasculares é única, o que, de acordo com Metcalfé (1960) e Ellis (1986) é uma característica de gramíneas panicóides.

As diferentes proporções de tecidos esclerenquimático, parenquimático e vascular nas regiões periférica, intermediária e central do sistema vascular das

populações das espécies brasileiras de *Saccharum* não foram utilizadas para a construção do dendograma (Fig. 5), por sofrerem influência ambiental, mesmo sob diferentes intensidades. Além de que, na análise de variância destas variáveis, não houve espécies significativamente distintas das demais (Tab. 3).

Neste estudo, foi realizada a análise anatômica do colmo das espécies brasileiras de *Saccharum*, não foi possível encontrar características distintas e diagnósticas para cada espécie, mas houve diferenças principalmente em relação às análises quantitativas. *Saccharum asperum* possui células comuns longas maiores, enquanto as células silicificadas e todos os tipos de tricomas são menores e significativamente diferentes das demais espécies; os maiores microtricomas estão presentes em *S. angustifolium*; a possível espécie nova (*S. sp*), além de apresentar complexos estomáticos com maior dimensão, destaca-se das demais pelo comprimento total do colmo, dos 2º e 3º entrenós, e espessura da parede maiores e significativamente distintos; *S. villosum* apresentou a maior diversidade de tipos celulares na epiderme. Todos esses dados confirmam que a taxonomia do “complexo *Saccharum*” é considerada confusa e novos trabalhos taxonômicos devem ser realizados para melhor delimitar as espécies brasileiras deste gênero.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília pela cessão de uso dos equipamentos, ao aluno de doutorado da UFRGS Cassiano Welker pela doação de material coletado, ao aluno de mestrado da UnB Bruno Edson Chaves e aos senhores Diasis Alvarenga, Joel Fernandes e Vandélio Mendes pelo auxílio nos trabalhos de campo.

Referências bibliográficas

- Ahmad, F.; Khan, M.A.; Ahmad, M.; Zafar, M.; Arshad, M.; Khan, A.; Shah, G.M. & Awan, M.R. 2010. Taxonomic utilization of anatomical characters in tribe Andropogoneae (Poaceae) based on transverse sections of leaves. **Journal of Medicinal Plants Research** 4: 1349-1358.
- Aliscioni, S.A. 2000. Anatomía ecológica de algunas especies del género *Paspalum* (Poaceae, Panicoideae, Paniceae). **Darwiniana** 38(3-4): 187-207.

- Artschwager, E. 1925. Anatomy of vegetative organs of sugarcane. **Journal of agricultural Research** 30(3): 197-241.
- Cheavegatti-Gianotto, A.; Abreu, H.M.C.; Arruda, P.; Bernalhok-Filho, J.C.; Burnquist, W.L.; Creste, S.; Ciero, L.D.; Ferro, J.A.; Filgueira, A.V.O.; Filgueiras, T.S.; Grossi-de-Sá, M.F.; Guzzo, E.C.; Hoffmann, H.P.; Landell, M.G.A.; Macedo, N.; Matsuoka, S.; Reinach, F.C.; Romano, E.; Silva, W.J.; Silva-Filho, M.C. & Ulian, E.C. 2011. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology** 4: 62–89.
- Clayton, W.D. & Renvoize, S.A. 1986. **Genera Graminum: Grass of the world**. London, Her Majesty's Stationery Office.
- Ellis, R.P. 1976. A procedure to standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. I. The leaf-blade as viewed in transverse section. **Bothalia** 12(1): 65-109.
- Ellis, R.P. 1979. A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. II. The epidermis as seen in surface view. **Bothalia** 12: 641-671.
- Ellis, R.P. 1986. A review of comparative leaf blade anatomy in systematic of the Poaceae: The past twenty-five years. Pp 3-10. In: Sodestrom, T.R.; Hilu, K.H.; Campbell, C.S. & Barkworth, M.E. (Eds). **Grass systematics and evolution**. Washington, Smithsonian Institution Press.
- Evert, R.F. 2006. **Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body – their structure, function and development**. New Jersey, A John Wiley & Sons Inc. Publication.
- Ferreira, E.A.; Demuner, A.J.; Silva, A.A.; Santos, J.B.; Ventrella, M.C.; Marques, A.E. & Procópio, S.O. 2005. Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. **Planta Daninha** 23(4): 611-619.
- Ferreira, E.A.; Ventrella, M.C.; Santos, J.B.; Barbosa, M.H.P.; Silva, A.A.; Procópio, S.O. & Silva, E.A.M. 2007. Leaf blade quantitative anatomy of sugarcane cultivars and clones. **Planta Daninha** 25(1): 25-34.
- Filgueiras, T.S. 2003. *Saccharum* L. Pp 550-557. In: Zuloaga, F.O.; Morrone, O.; Davidse, G.; Filgueiras, T.S.; Peterson, P.M.; Soreng, R.J. & Judziewicz, E.J. (Eds). **Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae and Danthonioideae**. Washington, Contributions from the United States National Herbarium.

- Filgueiras, T.S. & Welker, C.A.D. 2013. *Saccharum* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB13568>. Acessado em 06 maio 2013.
- García, M. & Jáuregui, D. 2008. Efecto de la salinización com NaCl o Na₂SO₄ sobre la anatomía foliar em dos genotipos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) con tolerancia salina diferencial. **Ernstia** **18**(1): 89-105.
- Graciano-Ribeiro, D.; Filgueiras, T.S. & Gonçalves, A.P.S. 2006. Roteiro mínimo para estudo anatômico dos bambus (Poaceae: Bambusoideae). Pp 69-74. In: Almeida, J.G. & Teixeira, A.A. (Eds.). Anais do I Seminário Brasileiro de Bambu. Brasília, Rede Brasileira de Bambu.
- Hefler, S.M. & Longhi-Wagner, H.M. 2010. A contribuição da anatomia foliar para a taxonomia das espécies de *Cyperus* L. subg. *Cyperus* (Cyperaceae) ocorrentes no sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica** **24**: 708-717.
- Hill, T. & Lewicki, P. 2007. **STATISTICS Methods and Applications**. Tulsa, StatSoft.
- Hodkinson, T.R.; Chase, M.W.; Lledó, M.D.; Salamin, N. & Renvoize, S.A. 2002. Phylogenetics of *Miscanthus*, *Saccharum* and related genera (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers. **Journal of Plant Research** **115**: 381–392.
- Jacobsen, K.R.; Fisher, D.G.; Marezki, A. & Moore, P.H. 1992. Developmental changes in the anatomy of the sugarcane stem in relation to phloem unloading and sucrose storage. **Botanica Acta** **105**:70-80.
- Kraus, J.E. & Arduim, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, EDUR.
- Langeron, M. 1949. **Précis de Microscopie**. Paris, Masson & Cie.
- Luque, R.; Sousa, H.C. & Kraus, J.E. 1996. Métodos de coloração de Roeser (1972) – modificado – e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alcião 8GS ou 8GX. **Acta Botanica Brasilica** **10**(2): 199-212.
- Media Cybernetics. 2009. **Image pro-plus, 7.0 for windows**. Silver Spring, Media Cybernetics.

- Melo, H.C.; Castro, E.M.; Soares, A.M.; Melo, L.A. & Alves, J.D. 2007. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea** **34**(2):145-153.
- Merida, T. 1970. Análisis de la productividad en cana de azúcar. IV Anatomia foliar de algunas variedades. **Turrialba** **20**(30): 307-310.
- Metcalf, C.R. 1960. **Anatomy of monocotyledons. I. Gramineae**. Oxford, Clarendon Press.
- Paiva, J.G.A.; Fank-de-Carvalho, S.M.; Magalhães, M.P. & Graciano-Ribeiro, D. 2006. Verniz vitral 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica** **20**(2): 257-264.
- Santos, A.S.; Desbies, A.L.J.; Alvarez, J.M.; Garcia, J.B. & Sobrinho, A.A.B. 2010. **Descritores epidérmicos de gramíneas (Poaceae) – um guia para identificação da dieta de herbívoros usando o programa Delta**. Corumbá, Embrapa Pantanal, Boletim de pesquisa e desenvolvimento.
- Soreng, R.J.; Davidse, G.; Peterson, P.M.; Zuloaga, O.; Judziewicz, E.J.; Filgueiras, T.S.; Morrone, O. & Romaschenko, K. 2013. A world-wide phylogeny classification of Poaceae (Gramineae). Disponível em: <http://www.tropicos.org/projectwebportal.aspx?pagename=ClassificationNWG&projectid=10>. Acessado em 06 dez 2013.
- Ullah, Z.; Khan, M.A.; Ahmad, M.; Zafar, M. & Ullah, K. 2011. Systematic implications of foliar epidermis in Andropogoneae (Poaceae) from Hindukush-himalayas Pakistan. **Journal of Medicinal Plants Research** **5**(6): 949-957.
- Watson, L.; Clifford, H.T. & Dallwitz, M.J. 1985. The classification of Poaceae: Subfamilies and Supertribes. **Australian Journal of Botany** **33**: 433-484.
- Watson, L. & Dallwitz, M.J. 1994. **The grass genera of the world**. Wallingford, CAB International.
- Watson, L. & Dallwitz, M.J. 1992. **The grass genera of the world**. Wallingford, CAB International.
- Welker, C.A.D.; Longhi-Wagner, H.M. 2012. The genera *Eriochrysis* P. Beauv., *Imperata* Cirillo and *Saccharum* L. (Poaceae – Andropogoneae – Saccharinae) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Botany** **35**: 87-105.

Tabela 1. Dados de coleta das populações das espécies de *Saccharum* analisadas.

Espécie (nº de coleta)	Município, Estado (coordenadas geográficas; altitude)	Data de Coleta
<i>S. villosum</i> (G178)	Brasília, DF (15°56'29.6"S 47°53'21.1"W; 1117 m)	03/06/2009
<i>S. villosum</i> (G179)	Brasília, DF (15°55'7.46"S 47°54'0.90"W; 1121m)	03/06/2009
<i>S. villosum</i> (G180)	Cavalcante, GO (13°35'078"S 47°31'45.0"W; 813m)	23/07/2009
<i>S. villosum</i> (G183)	Cavalcante, GO (13°48'17.3"S 47°27'50.8"W; 790m)	24/07/2009
<i>S. villosum</i> (G184)	Cavalcante, GO (13°48'0.75"S 47°27'6.01"W; 807m)	24/07/2009
<i>S. villosum</i> (G185)	Teresina de Goiás, GO (13°48'3.80"S 47°15'8.08"W; 756m)	25/07/2009
<i>S. villosum</i> (G186)	Mambá, GO (14°29'0.26"S 46°06'0.12"W; 689m)	12/12/2009
<i>S. villosum</i> (G190)	Mambá, GO (14°33'0.51"S 46°06'0.36" W; 685m)	12/12/2009
<i>S. villosum</i> (G199)	Brasília, DF (15°46'0.49"S 47°58'0.35"W; 1093m)	18/12/2009
<i>S. villosum</i> (G201)	Brasília, DF (15°43'54.0"S 047°53'30.5"W; 1165m)	18/12/2009
<i>S. villosum</i> (G202)	Planaltina, DF (15°34'32.0"S 047°36'29.8"W; 1036m)	20/01/2010
<i>S. villosum</i> (G209)	Guapó, GO (16°51'12.1"S 49°35'32.1"W; 810m)	05/02/2010
<i>S. villosum</i> (G210)	Rio Verde, GO (17°52'21.5"S 50°57'48.9"W; 701m)	06/02/2010
<i>S. villosum</i> (G212)	Rio Verde, GO (18°09'53.0"S 51°05'54.2"W; 623m)	06/02/2010
<i>S. villosum</i> (G214)	Aparecida do Rio Doce, GO (18°14'37.3"S 51°16'02.8"W; 590m)	06/02/2010
<i>S. villosum</i> (G215)	Jataí, GO (18°06'04.2"S 51°29'25.0"W; 690m)	06/02/2010
<i>S. villosum</i> (G218)	Indiara, GO (17°12'21.2"S 50°06'00.9"W; 510m)	07/02/2010
<i>S. villosum</i> (G219)	Guapó, GO (16°49'01.5"S 49°31'51.6"W; 688m)	07/02/2010
<i>S. villosum</i> (G226)	Gramado, RS (29°21'40.9"S 50°51'11.4"W; 1013m)	19/12/2010
<i>S. angustifolium</i> (G227)	São Francisco de Paula, RS (29°26'37"S 050°36'21"W; 907m)	19/12/2010
<i>S. villosum</i> (G236)	Alto Paraíso de Goiás, GO (14°08'12.1"S 47°42'57.3"W; 1208m)	14/02/2011
<i>S. sp</i> (G239)	Alto Paraíso de Goiás, GO (14°00'10.55"S 47°31'14" W; 1470 m)	15/02/2011
<i>S. villosum</i> (G245)	Guará, DF (15°49'58.4"S 47°57'53.3"W; 1047m)	24/02/2011
<i>S. villosum</i> (G254)	Mineiros, GO (18°15'32.0"S 52°53'22.3"W; 781m)	11/03/2011
<i>S. asperum</i> (G260)	Grande Sertão Veredas, MG (15°24'23.5"S 45°55'0.6"W; 816m)	12/04/2011
<i>S. angustifolium</i> (G278)	Porto Alegre, RS (29°51'18.9"S 050°56'54.0"W; 55m)	19/05/2011
<i>S. angustifolium</i> (G279)	Porto Alegre, RS (29°50'11.8"S 050°54'34.2"W; 35m)	19/05/2011
<i>S. asperum</i> (G280)	São Francisco de Paula, RS (29°27'35.1"S 050°36'51.2"W; 912m)	19/05/2011
<i>S. angustifolium</i> (G281)	Piratini, RS (31°17'28.0"S 052°47'16.0"W; 403m)	20/05/2011
<i>S. asperum</i> (W295)	Cambará do Sul, RS (29°04'46.5"S 50°10'38"W; 1031m)	28/02/2010
<i>S. asperum</i> (W312)	Ubirici, SC (28°03'9.7"S 49°22'42.6"W; 980m)	03/03/2010
<i>S. asperum</i> (G316)	Brasília, DF (15°55'51.4"S 47°54'02.1"W; 1044m)	25/11/2011
<i>S. asperum</i> (W10673)	Bom Jesus, RS (28°41'38.5"S 50°26'14.1"W; 1046m)	14/01/2009
<i>S. asperum</i> (W10683)	Bom Jesus, RS (28°38'9.9"S 50°28'8.8"W; 1046m)	14/01/2009
<i>S. asperum</i> (W10696)	Bom Jesus, RS (28°42'1.8"S 50°14'3.6"W; 1046m)	14/01/2009

G – coleta de Graciano-Ribeiro; W – coleta de Welker.

Tabela 2. Comprimentos (μm) das células epidérmicas e medidas morfológicas (cm) do colmo das espécies de *Saccharum* analisadas. Médias \pm desvios-padrões; letras diferentes em uma mesma coluna significam diferenças estatísticas ($p < 0.05$).

	C. longa	C. silicificada	C. estomático	Espinho	Microtricoma	Macrotricoma	Diâmetro	Entrenó	Parede	Total
<i>S.villosum</i>	146.96 \pm 37.83 ^a	15.96 \pm 3.49 ^a	31.50 \pm 4.56 ^a	32.52 \pm 13.82 ^a	70.07 \pm 19.9 ^a	353.55 \pm 217.88 ^a	0.71 \pm 0.17 ^a	38.7 \pm 9.32 ^a	0.23 \pm 0.08 ^a	265.32 \pm 55.59 ^a
<i>S.sp</i>	158.88 \pm 34.48 ^a	14.24 \pm 3.11 ^b	41.33 \pm 2.34 ^b	37.11 \pm 3.05 ^{ab}	87.29 \pm 14.34 ^a	335.17 \pm 32.81 ^{ab}	0.87 \pm 0.08 ^b	60.4 \pm 3.54 ^b	0.40 \pm 0.04 ^b	474.8 \pm 21.83 ^b
<i>S.angustifolium</i>	142.08 \pm 23.65 ^a	13.64 \pm 2.15 ^b	35.49 \pm 5.32 ^c	39.48 \pm 8.07 ^b	117.53 \pm 24.1 ^b	196.08 \pm 182.24 ^b	0.58 \pm 0.12 ^c	29.06 \pm 4.58 ^c	0.23 \pm 0.06 ^a	188.62 \pm 15.74 ^c
<i>S.asperum</i>	188.21 \pm 31.12 ^b	10.56 \pm 4.98 ^c	32.09 \pm 3.28 ^a	16.48 \pm 22.86 ^c	48.04 \pm 48.95 ^c	77.90 \pm 156.26 ^c	0.57 \pm 0.20 ^d	33.55 \pm 5.08 ^d	0.24 \pm 0.1 ^a	203.28 \pm 39.47 ^c

Tabela 3. Proporções de tecidos no colmo das espécies de *Saccharum* analisadas. Médias \pm desvios-padrões; letras diferentes em uma mesma coluna significam diferenças estatísticas ($p < 0.05$).

	Região Periférica			Região Intermediária			Região Central	
	Fibra	Vascular	Parênquima	Fibra	Vascular	Parênquima	Vascular	Parênquima
<i>S.villosum</i>	0.68 \pm 0.13 ^a	0.13 \pm 0.03 ^a	0.18 \pm 0.11 ^a	0.11 \pm 0.12 ^a	0.13 \pm 0.04 ^a	0.74 \pm 0.13 ^a	0.21 \pm 0.02 ^a	0.78 \pm 0.02 ^a
<i>S.sp</i>	0.62 \pm 0.01 ^{ac}	0.14 \pm 0.01 ^a	0.24 \pm 0.01 ^{ab}	0.12 \pm 0.01 ^a	0.14 \pm 0.01 ^{ab}	0.74 \pm 0.01 ^a	0.11 \pm 0.01 ^b	0.88 \pm 0.01 ^b
<i>S.angustifolium</i>	0.73 \pm 0.07 ^b	0.09 \pm 0.03 ^b	0.19 \pm 0.09 ^{ab}	0.38 \pm 0.20 ^b	0.14 \pm 0.01 ^{ab}	0.48 \pm 0.20 ^b	0.11 \pm 0.03 ^b	0.9 \pm 0.03 ^{bc}
<i>S.asperum</i>	0.64 \pm 0.12 ^c	0.14 \pm 0.03 ^a	0.22 \pm 0.10 ^b	0.23 \pm 0.14 ^c	0.14 \pm 0.05 ^b	0.63 \pm 0.18 ^c	0.10 \pm 0.02 ^c	0.90 \pm 0.02 ^c

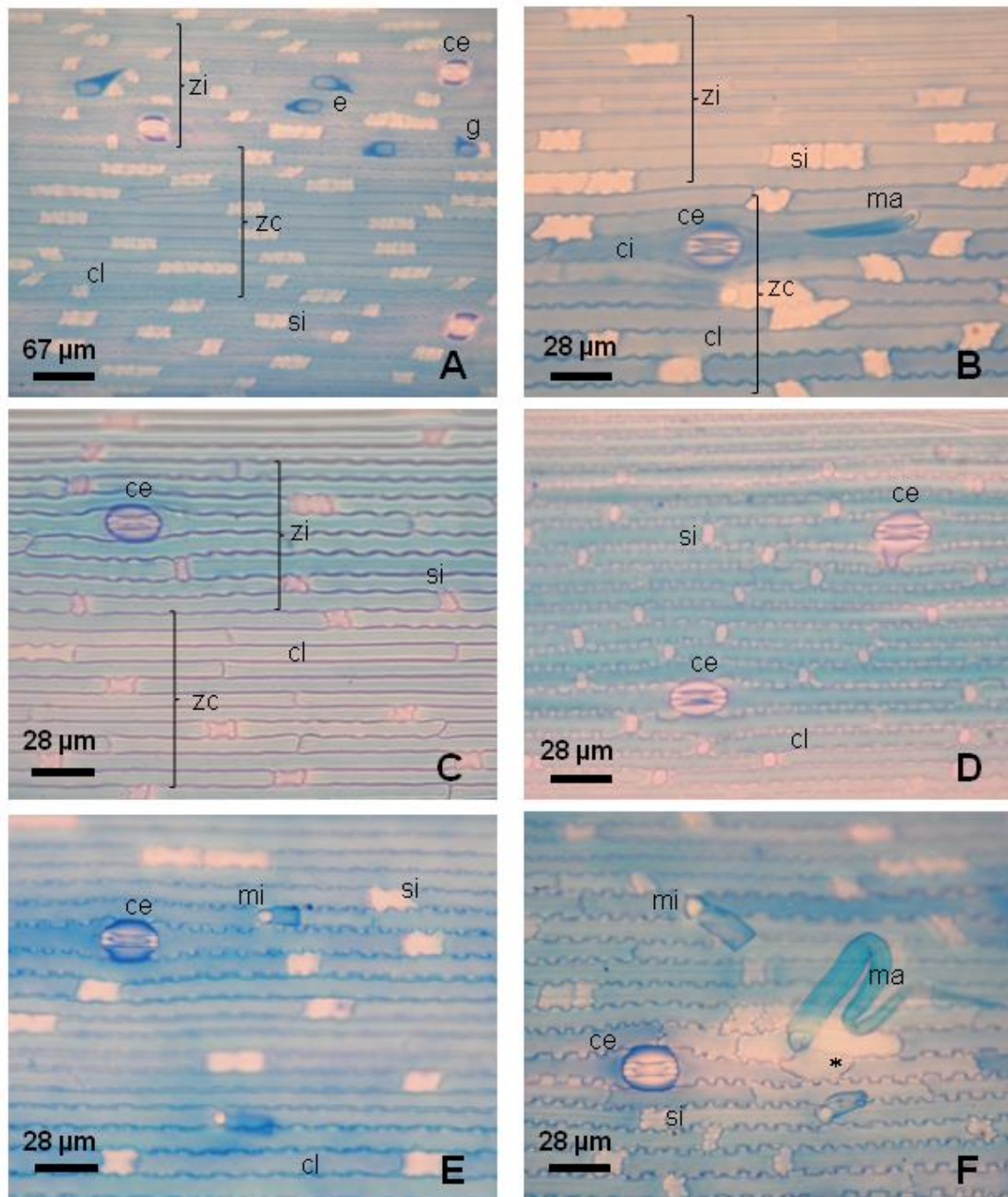


Figura 1. Vista frontal da epiderme do colmo. a *S. villosum* (179). b *S. angustifolium* (227). c *S. asperum* (10696). d *S. asperum* (312). e *S. asperum* (316). f *S. villosum* (186). Notam-se os diferentes tipos celulares, com tamanhos e frequência distintos, complexos estomáticos e tricomas restritos à zona intercostal. Abreviações: ce complexo estomático; ci célula interestomática; cl célula longa; e espinho; g gancho; ma macrotricoma; mi microtricoma; si célula silicificada; zc zona costal; zi zona intercostal; * células na base dos macrotricomas.

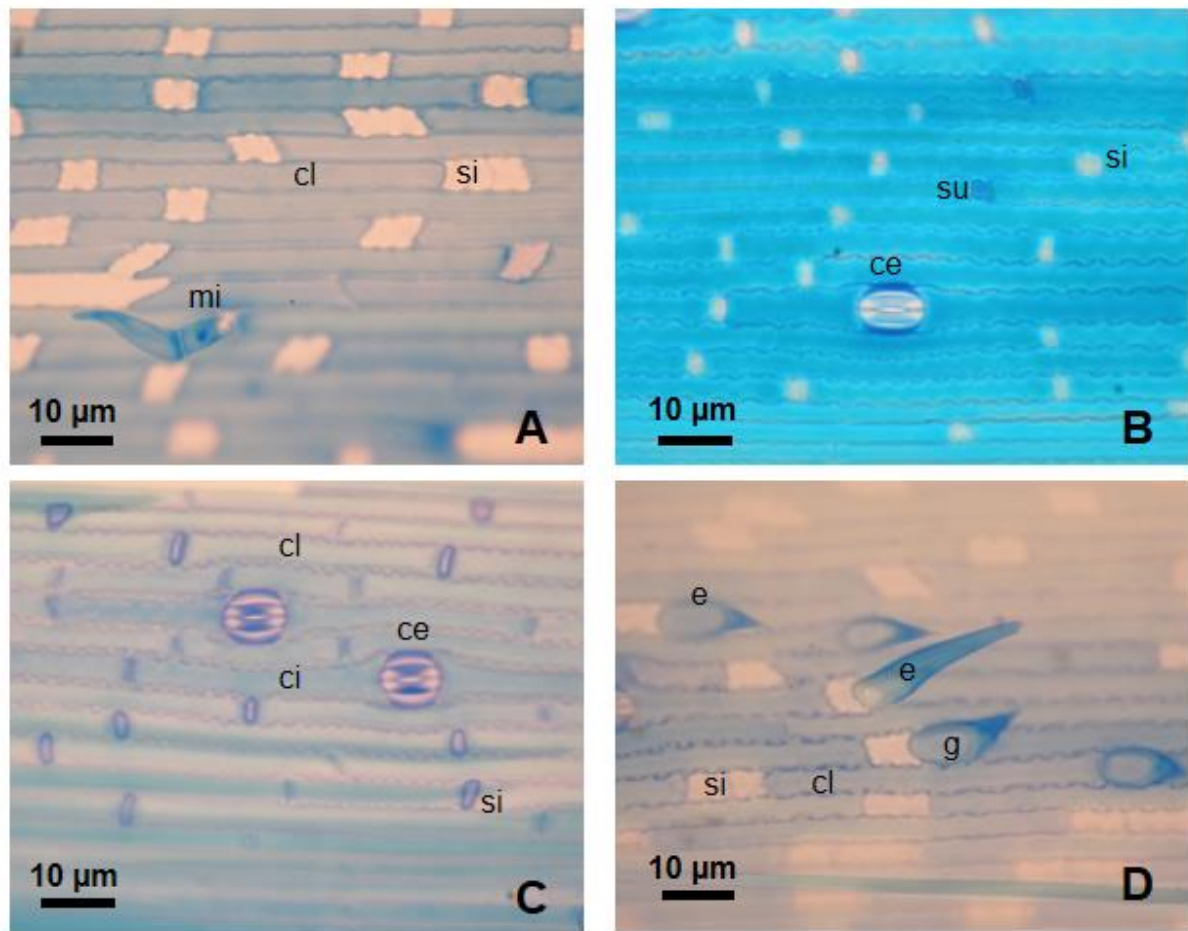


Figura 2. Vista frontal da epiderme do colmo. a *S. angustifolium* (227). b *S. angustifolium* (10683). c *S. asperum* (295). d *S. asperum* (260). Notam-se os diferentes tipos celulares, em maior aumento. Abreviações: ce complexo estomático; ci célula interestomática; cl célula longa; e espinho; g gancho; mi microtricoma; si célula silicificada; su célula suberosa.

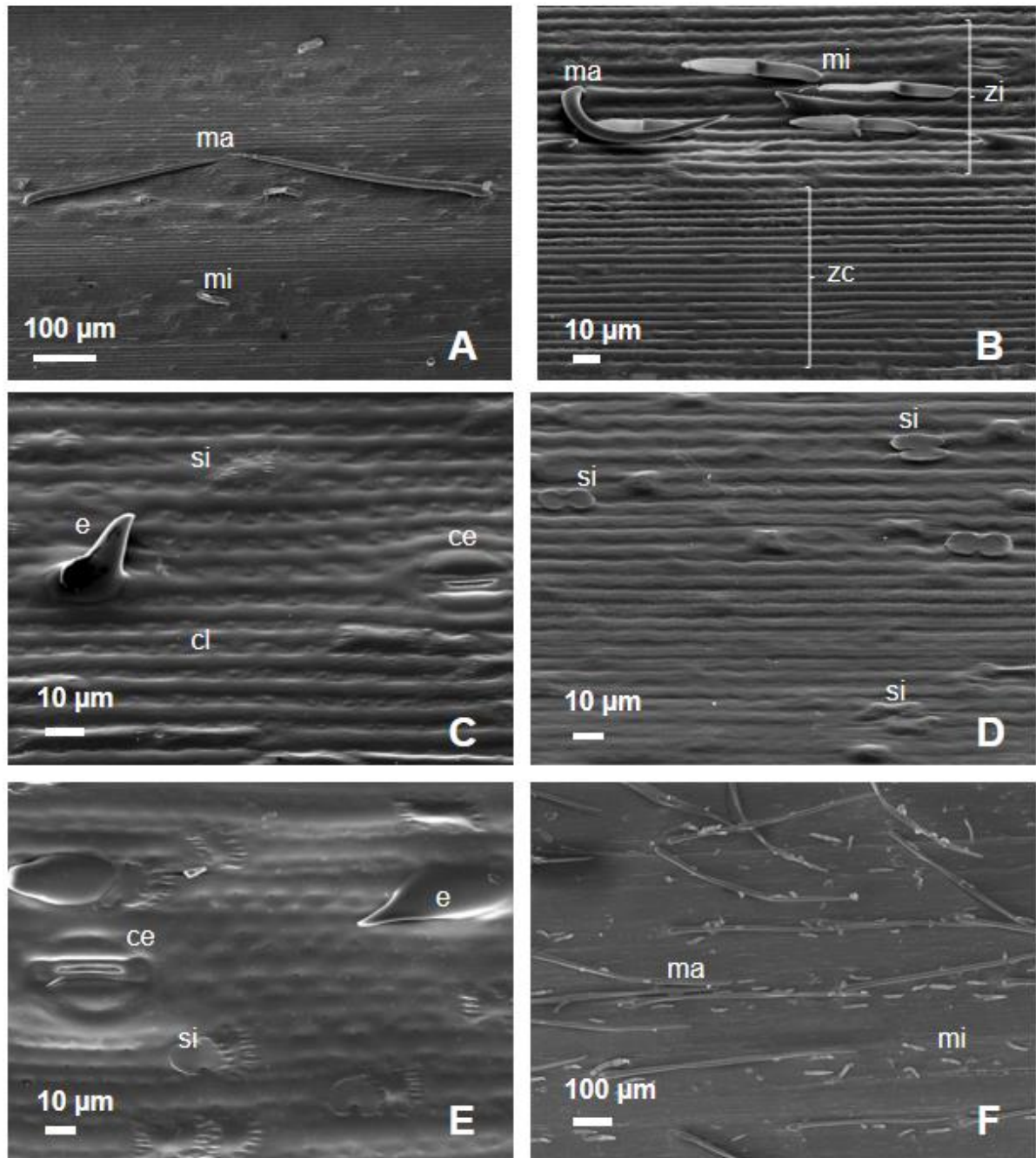


Figura 3. Epiderme do colmo sob microscopia eletrônica de varredura. a *S. sp* (239). b *S. angustifolium* (279). c *S. asperum* (280). d *S. asperum* (312). e *S. villosum* (180). f *S. villosum* (219). Ocorre diversidade morfológica dos espinhos e células silicificadas, além de densidade distinta de tricomas. Abreviações: ce complexo estomático; cl célula longa; e espinho; ma macrotricoma; mi microtricoma; si célula silicificada; zc zona costal; zi zona intercostal.

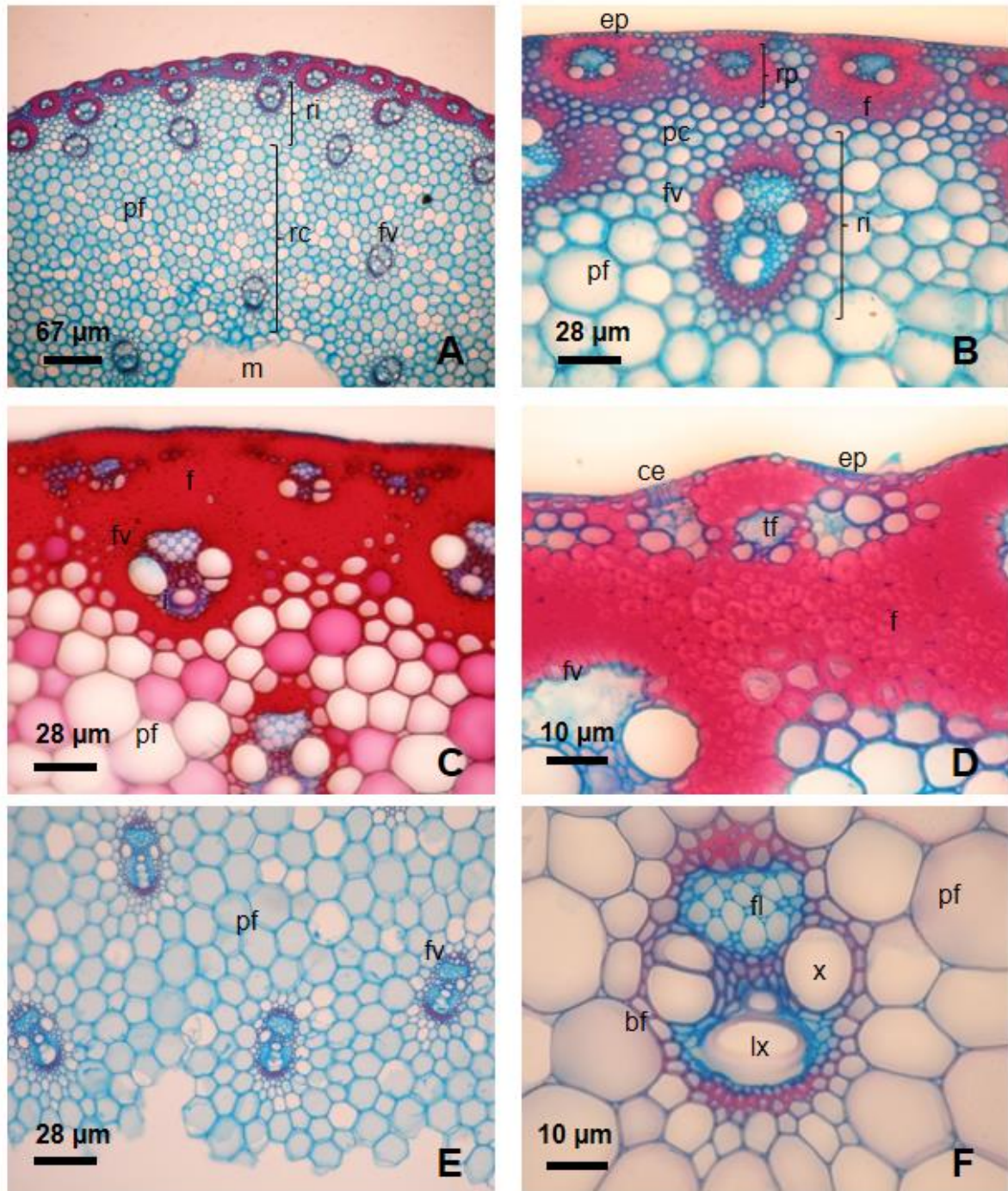


Figura 4. Secções transversais do colmo. a aspecto geral de *S. villosum* (236). b detalhe da região periférica de *S. asperum* (260). c detalhe da região periférica de *S. asperum* (10683). d detalhe da região periférica de *S. villosum* (199). e feixes na região central de *S. asperum* (295). f detalhe do feixe da região central de *S. asperum* (10683). Observa-se epideme uniestratificada, diferentes proporções de parênquima e esclerênquima no córtex e feixes vasculares revestidos por bainha única. Abreviações: bf bainha do feixe vascular; ce complexo estomático; ep epiderme; f fibras; fl floema primário; fv feixe vascular; lx lacuna do protoxilema; pc parênquima clorofiliano; pf parênquima fundamental; rc região central; ri região intermediária; tf traço foliar; x elemento de vaso do metaxilema.

7. CAPÍTULO 3*

*Para este capítulo seguiram-se as normas do periódico Life Sciences.

Silvia Dias da Costa Fernandes

Parede celular e teores de carboidratos não estruturais, lignina e silício em colmos das espécies brasileiras de *Saccharum* L. (Poaceae)

Resumo

A cana-de-açúcar é uma importante cultura da família Poaceae, devido à sua capacidade de acumular alta concentração de sacarose nos seus colmos, ao invés do amido, considerado uma forma importante de reserva, mas que promove a perda ou a produção ineficiente de açúcar quando presente nos colmos de cana-de-açúcar. Outras substâncias que interferem na qualidade desta cultura são lignina e sílica, ambas relacionadas com a resistência vegetal, mas que limitam o uso como ração animal, pois dificultam a digestão, além disso a extração da lignina para produção de biocombustíveis é um processo oneroso. Este trabalho teve como objetivo analisar a estrutura da parede celular e dos teores de carboidratos não estruturais, lignina e silício em colmos das espécies brasileiras de *Saccharum* (*S. angustifolium*, *S. asperum* e *S. villosum*) para auxiliar a implementação de novas estratégias de melhoramento da cultura da cana-de-açúcar. Os colmos das 3 espécies nativas de *Saccharum* apresentam baixa concentração de amido. *Saccharum asperum* é a espécie que possui maior quantidade de carboidratos solúveis. Não há diferenças significativas quanto aos teores de lignina solúvel, já quanto à lignina insolúvel, *S. villosum* é a espécie com menor quantidade deste composto. O teor de silício ocorre em ordem decrescente em *S. villosum*, *S. angustifolium* e *S. asperum*. *Saccharum asperum* e *S. villosum* apresentam maior espessura e quantidade de camadas nas paredes secundárias das fibras, conseqüentemente são as espécies com maior resistência nos colmos.

Palavras-chave: açúcares solúveis, amido, cana-de-açúcar, caule, sílica

Introdução

Como uma das maiores famílias de angiospermas, as gramíneas (Poaceae) são de particular interesse ao homem por incluir espécies importantes na alimentação humana como *Triticum aestivum* L. (trigo), *Zea mays* L. (milho), *Oryza sativa* L. (arroz) e *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar). Incluem também espécies forrageiras, como *Urochloa decumbens* (Stapf) Webster (braquiária) e *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs (capim-colonião), fontes principais de alimentação para o

gado. Além disso, diversos membros da família são dominantes ecológicos, cobrindo cerca de 20% da superfície terrestre (Kellogg 2001).

A cana-de-açúcar é uma importante cultura desta família, sua utilização para produção de etanol no Brasil, desde a década de 1970, é o melhor exemplo de incentivo a energias renováveis (Goldemberg 2007). É mundialmente a cultura líder em termos energéticos, devido à sua capacidade de armazenar alta concentração de sacarose nos colmos, mas existe variabilidade entre as cultivares em relação à quantidade de fotoassimilados que é utilizada para o crescimento e aquela que será armazenada como sacarose ou amido (Verma et al. 2013). O amido é considerado como a forma mais importante de reserva nas plantas em termos de quantidade produzida, distribuição entre as diferentes espécies e importância comercial (Zeeman et al. 2004). No entanto, a presença de amido nos colmos de cana-de-açúcar aumenta a viscosidade, inibe a cristalização e representa perda de sacarose no melaço, o que pode promover perda ou produção ineficiente em usinas de açúcar (Figueira et al. 2011).

Esta cultura não só acumula grandes quantidades de sacarose nos colmos, como também produz grande biomassa lignocelulósica (Casu et al. 2007), o bagaço, que pode ser pré-tratado para a extração de lignina para que a celulose seja hidrolisada e libere glicose, que por sua vez é fermentada e convertida em etanol de segunda geração (Rabelo et al. 2011). Entretanto, a resistência das paredes celulares, devido principalmente à presença de lignina é ainda um grande obstáculo para a utilização do bagaço como fonte para os biocombustíveis (Vanholme et al. 2010), uma vez que o processo de extração é oneroso e muitas vezes requer altas temperaturas (Kiyota et al. 2012). Melhorias nesses pré-tratamentos estão sendo desenvolvidas, porém a engenharia genética de plantas tem sido uma outra abordagem, alterando a composição da lignina e seu conteúdo nas plantas (Mansfield 2009).

A lignina está envolvida no suporte mecânico, resistência ao estresse, pragas e doenças (Bhuiyan et al. 2009), não podendo ser simplesmente eliminada ou drasticamente reduzida nas plantas. Mas o seu elevado teor, além de dificultar a produção de biocombustíveis, limita o seu uso como ração animal (Kiyota et al. 2012). Problemas de digestibilidade também podem ser ocasionados por alta concentração de silício, que é particularmente abundante nas paredes celulares das gramíneas, principalmente em células especializadas da epiderme (Parry et al. 1984).

De acordo com Nassar et al. (2008), a utilização de híbridos entre as cultivares e as espécies nativas não cultivadas relacionadas é uma das maneiras de alcançar o progresso no setor agropecuário, uma vez que a introdução de novos germoplasmas pode promover desenvolvimento e melhoria nas cultivares de cana-de-açúcar (Tai & Miller 2002). Além de *S. officinarum*, no Brasil ocorrem *S. angustifolium* (Nees) Trin., *S. asperum* (Nees) Steud. e *S. villosum* Steud. (Filgueiras et al. 2010), porém as informações sobre essas espécies nativas são escassas ou até mesmo ausentes, o que dificulta a distinção entre elas, ou a possível utilização em programas de melhoramento para a cultura. Assim, o conhecimento acerca da estrutura da parede celular e dos teores de carboidratos não estruturais (solúveis e amido), lignina e silício em colmos das espécies brasileiras de *Saccharum* faz-se necessário, pois poderá auxiliar a implementação de novas estratégias para aprimorar a cultura da cana-de-açúcar.

Material e Métodos

As coletas foram feitas apenas em populações que estavam em estágio fértil, permitindo a identificação das espécies. O material foi incorporado no herbário da Universidade de Brasília (UB), sendo que cada população analisada foi identificada pelo seu número de coleta. Amostras da região mediana dos 2º e 3º entrenós foram obtidas de três populações de *S. angustifolium* (227, 279 e 281, todas oriundas do Rio Grande do Sul), três de *S. asperum* (280 do Rio Grande do Sul, e 316 e 317 do Distrito Federal) e três de *S. villosum* (210 e 254 de Goiás, e 226 do Rio Grande do Sul). Para cada protocolo utilizado, houve diferentes formas de preservação do material coletado.

Para a quantificação dos carboidratos não estruturais e da lignina, as amostras dos colmos foram congeladas e liofilizadas durante 48h, posteriormente foram pulverizadas em moinho de facas até as partículas estarem reduzidas para passarem em peneira de 40 mesh. Os carboidratos solúveis foram extraídos com etanol 80% a 80°C (três vezes) e determinados pelo método do fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956). A concentração de amido foi medida a partir dos peletes obtidos com a extração dos carboidratos solúveis, seguindo o método enzimático descrito por Amaral et al. (2007).

O teor de lignina solúvel em ácido sulfúrico foi determinado de acordo com Ehrman (1996). Após a extração da lignina solúvel, obteve-se o resíduo que contém lignina insolúvel em ácido e proteínas condensadas a partir da amostra inicial. Assim, os valores referentes a lignina insolúvel não representam apenas este composto, mas como

o objetivo foi realizar análise comparativa entre as espécies, pode-se aplicar o processo proposto por Ehrman & Templeton (1995), não sendo necessária uma análise de nitrogênio para determinar o teor de lignina insolúvel em separado a partir da fração de proteína.

O conteúdo de cada composto foi calculado em relação à massa seca da amostra. Usou-se o delineamento inteiramente casualizado, onde foram feitas análises de variância, com pós-teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade com auxílio do programa Statistica 8.0 (Hill & Lewicki 2007).

Para a microscopia eletrônica, as amostras foram fixadas em Karnovsky (1965). Para a análise de silício nas células epidérmicas dos colmos, as amostras foram desidratadas em série acetônica, secas ao ponto crítico, cobertas com carbono e expostas ao coletor de raios-X (SDD) EDS acoplado ao microscópio eletrônico de varredura JEOL JEM 840. Para a visualização das paredes celulares das fibras ao redor dos feixes vasculares localizados no centro do colmo, as amostras foram contrastadas *in block* com acetato de uranila, desidratadas em série acetônica, infiltradas e inclusas em resina Spurr (Bozzola & Russel 1992), sendo os cortes ultrafinos (90nm) examinados em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1011.

Resultados e Discussão

Carboidratos não estruturais e lignina

Nas plantas os carboidratos podem ser encontrados como numerosos glicosídeos requeridos para a síntese de outros metabólitos, reserva energética, além de constituintes estruturais da parede. Os colmos das 3 espécies nativas de *Saccharum* apresentam baixa concentração de amido em comparação à concentração dos carboidratos solúveis (Tab. 1). Mesmo se tratando de espécies nativas, que não passaram por processos de melhoramento genético, foi observada maior reserva energética sob forma de carboidratos solúveis.

Um dos principais objetivos em programas de melhoramento de cana-de-açúcar é o aumento do teor de açúcares solúveis, o que gera alto retorno econômico a canaviais e engenhos. Além da escala Brix, pode-se estimar a concentração de sacarose pelo teor de açúcares solúveis (Jackson 2005). A estimativa da concentração de sacarose é

importante pelo fator econômico e por esta molécula servir de base para construção de outros carboidratos de reserva, como o amido.

O amido é o segundo principal carboidrato em plantas, mas o seu sítio de deposição difere do da sacarose, sendo em cloroplastos nas folhas e em amiloplastos nos tecidos não fotossintetizantes, como parênquima de raízes e caules, tubérculos, endosperma ou cotilédones de sementes (Amaral et al. 2007). Esta reserva é mais abundante nas folhas e nas regiões de crescimento em cana-de-açúcar, mas também pode ser encontrada nos colmos, tanto que vários produtos da cultura apresentam amido na sua composição (Figueira et al. 2011).

Saccharum angustifolium é a espécie que possui mais amido e, conseqüentemente, menos carboidratos solúveis. Existe uma relação dinâmica ativa do fluxo de açúcares entre o amido e a sacarose, mas a transferência destes não é direta e envolve diversos processos enzimáticos (Avigad & Dey 1997). *Saccharum asperum* é a espécie que possui maior quantidade de carboidratos solúveis, apesar da concentração de açúcares solúveis ser geralmente inversamente proporcional a de amido, o teor de amido desta espécie não difere de *S. villosum* (Tab. 1).

A qualidade das forragens, ou o possível uso para produção de etanol de segunda geração, está diretamente ligada às características da organização estrutural, então além dos carboidratos de reserva, é necessária a análise das paredes celulares. A parede celular das Poales, ordem a qual pertence *Saccharum*, é do tipo II, geralmente pobre em pectinas e proteínas estruturais, mas são ricas em compostos fenólicos, como a lignina (Carpita & McCann 2000). Segundo Vogel (2008), a lignina compreende uma porção substancial da parede celular secundária das gramíneas e essencialmente preenche os poros entre os polissacarídeos. Os dados obtidos nas três espécies de *Saccharum* confirmam a grande quantidade de lignina citada, principalmente a lignina insolúvel, cuja quantidade representa o triplo da quantidade de amido (Tab. 1).

Ao contrário dos outros componentes da parede celular da biomassa, a lignina é mais insolúvel em ácidos minerais, podendo ser analisada por métodos gravimétricos após a hidrólise da celulose e hemicelulose, obtendo-se a lignina solúvel (Ehrman & Templeton 1995). Nas espécies brasileiras de *Saccharum* não houve diferenças significativas quanto aos teores de lignina solúvel (Tab. 1).

As espécies que apresentaram maior proporção de lignina insolúvel foram *S. angustifolium* e *S. asperum*, diferindo significativamente de *S. villosum*, espécie com

menor quantidade deste composto (Tab. 1). De acordo com Silva et al. (2005), cultivares da mesma espécie e espécies de mesmo gênero podem apresentar incrementos de lignina diferenciados, o que influencia na digestibilidade da forragem e resistência do vegetal.

Como mencionado na introdução, a presença de lignina é ainda um grande obstáculo para a utilização do bagaço como fonte para os biocombustíveis (Vanholme et al. 2010), outro fator negativo da presença de lignina e do espessamento das paredes celulares é o menor aproveitamento de energia disponível nas forragens tropicais, porque os microrganismos que habitam o rúmen de alguns herbívoros possuem a capacidade de digerir a celulose e não a lignina (Silva et al. 2005). No entanto, a lignificação pode proporcionar um aumento na resistência das paredes à ação de enzimas degradadoras, impedir a difusão de toxinas do patógeno em direção ao hospedeiro, impedir a difusão de nutrientes da planta hospedeira em direção ao patógeno e restringir a colonização por patógenos (Pascholati & Leite 1995).

Silício

Em vista frontal, sob microscopia eletrônica de varredura, é possível visualizar a epiderme composta por células longas, silicificadas, complexos estomáticos e tricomas, estes podendo ser do tipo espinho, gancho, microtricoma, ou macrotricoma (Fig. 1A-F). As três espécies não são caracterizadas por tipos celulares distintos, diferentes populações de uma mesma espécie podem apresentar todas as células mencionadas ou carecer de tricomas, apenas espinhos e ganchos estão sempre presentes. As principais diferenças estão na densidade e tamanho das células.

Nas espécies nativas de *Saccharum*, a distribuição de silício não é uniforme, podendo estar presente em diferentes células, não apenas nas silicificadas, mas também nas subsidiárias, espinhos e ganchos (Fig. 1D-F). Sakai & Sanford (1984) analisando cultivares de cana-de-açúcar, também verificaram presença de silício em diferentes tipos celulares nas folhas, inclusive nos macro e microtricomas, diferindo das espécies nativas analisadas aqui, uma vez que a menor proporção de silício é nos macrotricomas (Fig. 1E).

O silício é absorvido pelas raízes na forma de ácido monossilícico, seu transporte é via xilema e pode ser regulado pela transpiração, sendo depositado principalmente nas paredes das células da epiderme (Rodrigues et al. 2011). Motomura et al (2000)

afirmam que vários fatores estão associados à deposição de silício nas plantas, como pH e disponibilidade de nutrientes no solo. Apesar da comprovada influência ambiental, a quantidade de silício foi similar entre diferentes populações de uma mesma espécie, e diferente entre as espécies, independente da região geográfica de origem, ocorrendo em ordem decrescente em *S. villosum*, *S. angustifolium* e *S. asperum* (Fig. 1G-I).

A presença de silício nas espécies nativas de *Saccharum* é interessante em termos de melhoramento da cultura da cana-de-açúcar, já que a acumulação de silício em diversas culturas pode resultar em aumento da produtividade provavelmente devido à redução da transpiração e aumento da resistência a doenças e pragas (Braga et al. 2009) e ao acamamento (Rodrigues et al. 2011). Além disso, Reynolds et al (2009) verificaram que a ação do silício sobre os insetos herbívoros pode gerar desgaste da mandíbula, redução no crescimento e na reprodução desses insetos, efeitos associados à redução dos danos para a cultura. No entanto, em se tratando de forragicultura, a degradação por microrganismos ruminais em bovinos é muito reduzida em células silicificadas (Silva et al. 2005).

Paredes celulares

As paredes celulares são constituídas por numerosos grupos de carbono orgânico, variam enormemente em suas composições e propriedades físicas, dependendo do tipo de célula e das espécies de plantas (Souza et al. 2010). No entanto, todas as plantas possuem uma composição básica semelhante nas suas paredes celulares, microfibrilas de celulose dispostas em uma matriz, que é composta principalmente de polissacarídeos não celulósicos com uma variedade de estruturas diferentes, como proteínas estruturais, glicoproteínas, e compostos fenólicos, incluindo a lignina (Harris & Smith 2006).

Os teores de lignina insolúvel apresentados anteriormente foram distintos entre algumas espécies de *Saccharum*, o que está de acordo com Harris & Smith (2006), uma vez que cada espécie possui tipos celulares diferentes, o que faz com que a composição da matriz varie e, além disso, as paredes do mesmo tipo celular em diferentes grupos de plantas podem ter composições distintas dos polissacarídeos da matriz.

Independente da complexidade dos tipos de parede, dois tipos são reconhecidos, primária e secundária. A parede primária é relativamente não especializada e é similar na arquitetura molecular em todos tipos de células, embora a sua ultraestrutura possa

variar amplamente. A parede celular secundária se deposita geralmente após a parada do crescimento, podendo se tornar altamente especializada na estrutura e composição, refletindo o estado diferenciado da célula (Mauseth 1988).

A observação da parede celular das fibras adjacentes aos elementos de vaso do metaxilema das espécies nativas de *Saccharum* (Fig. 2A), sob microscopia eletrônica de transmissão, permitiu verificar a comunicação via pontuações (Fig. 2B-C), espaços intercelulares com ou sem conteúdo aparente (Fig. 2C-E), além de distinguir as camadas correspondentes a lamela média, parede primária e parede secundária, esta última com distinção de camadas adicionais (Fig 2D-F). De acordo com Gritsch & Murph (2005), nas paredes secundárias estruturais pode haver número distinto de camadas que diferem entre si pela composição química, mas principalmente pela orientação das microfibrilas de celulose, sendo que esta estrutura laminada aumenta sensivelmente a resistência dessas paredes.

As camadas adicionais de parede secundária foram observadas em *S. asperum* (Fig. 2E) e *S. villosum* (Fig. 2F), mas não em *S. angustifolium* (Fig. 2D). Cesarino et al. (2012) verificaram que em cana-de-açúcar a espessura da parede secundária das fibras é diretamente proporcional ao grau de maturação, entretanto, todas as amostras de *Saccharum* foram padronizadas, retiradas dos 2º e 3º entrenós apenas de indivíduos em estágio de floração. Assim, nossos resultados estão de acordo com Emons & Mulder (2000), que afirmam que o padrão formado pelas microfibrilas de celulose nas paredes, além de ser específico do tipo celular e do estágio de desenvolvimento, é variável entre espécies.

Segundo Gritsch & Murph (2005), um dos principais determinantes das propriedades de resistência dos colmos é a quantidade de camadas múltiplas nas paredes secundárias, que se dá devido à alternância da orientação das microfibrilas de celulose. Desta maneira, *S. asperum* (Fig. 2E) e *S. villosum* (Fig. 2F) por apresentarem maior espessura e quantidade de camadas nas paredes secundárias das fibras, são as espécies com maior resistência quando comparadas a *S. angustifolium* (Fig. 2D).

Conclusão

Os colmos das 3 espécies nativas de *Saccharum* apresentam baixa concentração de amido em comparação à concentração dos carboidratos solúveis. Os dados obtidos mostram que *S. villosum* apresenta a maior quantidade de características desejáveis para

melhoria da cultura da cana-de-açúcar, como espessura da parede secundária das fibras, baixos teores de amido e lignina insolúvel, além do alto teor de sílica, que pode ser interpretado como resistência a doenças e pragas.

Agradecimentos

Aos laboratórios da Universidade de Brasília - microscopia eletrônica pelo uso dos microscópios, ecologia pelo uso do moinho de facas, bioquímica vegetal pelo uso dos equipamentos para as análises dos carboidratos não estruturais. Ao laboratório de produtos florestais do IBAMA pelo uso dos equipamentos para as análises de lignina.

Referências Bibliográficas

- Amaral, L.I.V.; Gaspar, M.; Costa, P.M.F.; Aidar, M.P.M.; Buckeridge, M.S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração de amido em materiais vegetais. **Hoehnea** **34(4)**: 425-431.
- Avigad, C.; Dey, P. M. 1997. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. Pp. 143-203. In: P.M. Dey & J.B Harborne (eds.). **Plant Biochemistry**. London, Academic Press.
- Bhuiyan, N. H.; Selvaraj, G.; Wei, Y.; King, J. 2009. Role of lignification in plant defense. **Plant Signaling and Behavior** **4**: 158–159.
- Bozzola, J.J.; Russel, L.D. 1992. **Electron microscopy principles and techniques for biologists**. Boston, Ma. Ed. Jones & Bartlett.
- Braga, F.T.; Nunes, C.F.; Favero, A.C.; Pasqual, M.; Carvalho, J.G.; Castro, E.M. 2009. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **44**: 128-132.
- Carpita, N.C.; McCann, M. 2000. The cell wall. In: **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Buchanan, B.B.; Gruissen, W. & Jones, R.L. (eds.). American Society of Plant Physiologists, Rockville. 52-108 pp.
- Casu, R.E.; Jarmey, J.M.; Bonnett, G.D.; Manners, J.M. 2007. Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling. **Functional and Integrative Genomics** **7**: 153-167.

- Cesarino, I.; Araújo, P.; Mayer, J.L.S.; Leme, A.F.P.; Mazzafera, P. 2012. Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development. **Plant Physiology and Biochemistry** **55**: 66-76.
- Dubois, M.; Gilles, A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** **28**: 350-355.
- Ehrman, T. 1996. **Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass**. NREL ethanol project. Laboratory Analytical Procedure (LAP 004). Golden, CO.
- Emons, A.M.C.; Mulder, B.M. 2000. How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. **Trends in Plant Science** **5(1)**: 35-40.
- Figueira, J.A.; Carvalho, P.H.; Sato, H.H. 2011. Sugarcane starch: quantitative determination and characterization. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** **31(3)**: 806-815.
- Filgueiras, T.S.; Longhi-Wagner, H.M.; Viana, P.L.; Zanin, A.; Guglieri, A.; Oliveira, R.C.; Canto-Dorow, T.S.; Shirasuna, R.T.; Valls, J.F.M.; Oliveira, R.P. 2010. Poaceae. In: Forzza RC (eds) **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Vol. 2. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp 1464-1520.
- Goldemberg, J. 2007. Ethanol for a sustainable energy future. **Science** **315**: 808-810.
- Gritsch, C.S.; Murphy, R.J. 2005. Ultrastructure of fiber and parenchyma cell walls during early stages of culm development in *Dendrocalamus asper*. **Annals of Botany** **95**: 619-629.
- Harris, P.J.; Smith, B.G. 2006. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. **International Journal of Food Science and Technology** **41(2)**: 129-143.
- Hill, T.; Lewicki, P. 2007. **STATISTICS** Methods and Applications. Tulsa, OK: StatSoft.
- Jackson, P.A. 2005. Breeding for improved sugar content in sugarcane. **Field Crop Research** **92**: 277-290.
- Karnovskyy, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** **27**: 137-138.
- Kellogg, E.A. 2001. Evolutionary history of the grasses. **Plant Physiology** **125**: 1198-1205.

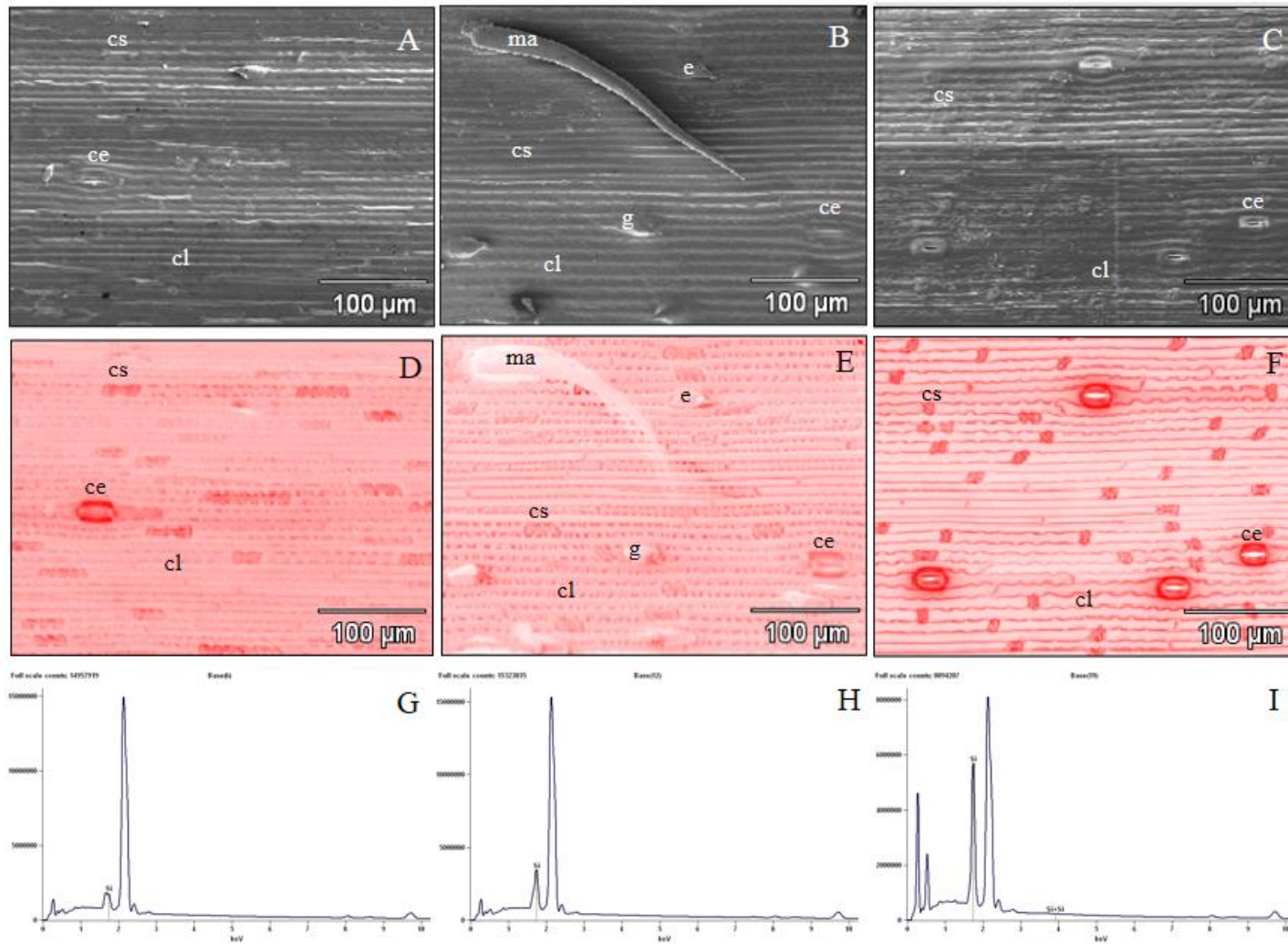
- Kiyota, E.; Mazzafera, P.; Sawaya, A.C.H.F. 2012. Analysis of soluble lignin in sugarcane by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with a do-it-yourself oligomer database. **American Chemical Society** **84**: 7015-7020.
- Mansfield, S. D. 2009. Solutions for dissolutions - engineering cell walls for deconstruction. **Current Opinion in Biotechnology** **20**: 286–294.
- Mauseth, J.D. 1988. **Plant anatomy**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, CA. 560 pp.
- Motomura, H.; Fujii, T.; Suzuki, M. 2000. Distribution of silicified cells in the leaf blades of *Pleioblastus chino* (Franchet et Savatier) Makino (Bambusoideae). **Annals of Botany** **85**: 751-757.
- Nassar, N.M.A.; Hashimoto, D.Y.C.; Fernandes, S.D.C. 2008. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research** **7(1)**: 16-28.
- Parry, D.W.; Hodson, M.J.; Sangster, A.G. 1984. Some recent advances in studies of silicon in higher plants. **Philosophical Transactions B** **304**: 537–49.
- Pascholati, S.F. & Leite, B. 1995. Hospedeiro: mecanismos de resistência. Pp. 417-453. In: A. Bergamini-Filho; H. Kimati & L. Amorim. **Manual de Fitopatologia**. v.I. Princípios e Conceitos, 3 ed. São Paulo, Agronômica Ceres Ltda.
- Rabelo, S.C.; Carrere, H.; Maciel Filho, R.; Costa, A.C. 2011. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology** **102**: 7887-7895.
- Reynolds, A.G.; Keeping, M.G.; Meyer, J.H. 2009. Silicon-augmented resistance of plants to herbivorous insects: a review. **Annals of Applied Biology** **155**: 171-186.
- Rodrigues, F.A.; Oliveira, L.A.; Korndörfer, A.P.; Korndörfer, G.H. 2011. Silício: um elemento benéfico e importante para as plantas. **Informações Agronômicas** **134**: 14-20.
- Sakai, W.S.; Sanford, W.G. 1984. A developmental study of silification in the abaxial epidermal cells of sugarcane leaf blades using scanning electron microscopy and energy dispersive x-ray analysis. **American Journal of Botany** **71**: 1315-1322.
- Silva, L.M.; Alquini, Y.; Cavallet, V.J. 2005. Inter-relações entre anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasílica** **19(1)**: 183-194.

- Souza, A.; Moraes, M.G.; Ribeiro, R.C.L.F. 2005. Gramíneas do Cerrado: carboidratos não estruturais e aspectos ecofisiológicos. **Acta Botanica Brasilica** **19(1)**: 81-90.
- Souza, A.; Sandrin, C.Z.; Calió, M.F.A.; Meirelles, S.T.; Pivello, V.R.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2010. Seasonal variation of soluble carbohydrates and starch in *Echinolaena inflexa*, a native grass species from the Brazilian savanna, and in the invasive grass *Melinis minutiflora*. **Brazilian Journal of Biology** **70(2)**: 395-404.
- Tai, P.Y.P.; Miller, J.D. 2002. Germplasm diversity among for sugarcane species for sugar composition. **Crop Science** **42**: 958-964.
- Templeton, D.; Ehrman, T. 1995. **Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass** NREL ethanol project. Laboratory Analytical Procedure (LAP 003). Golden, CO.
- Vanholme, R.; Van Acker, R.; Boerjan, W. 2010. Potential of *Arabidopsis* systems biology to advance the biofuel field. **Trends in Biotechnology** **28**: 543-547.
- Verma, A.K.; Agarwal, A.K.; Dubey, R.S.; Solomon, S.; Singh, S.B. 2013. Sugar partitioning in sprouting lateral bud and shoot development of sugarcane. **Plant Physiology and Biochemistry** **62**: 111-115.
- Vogel, J. 2008. Unique aspects of the grass cell wall. **Current Opinion in Plant Biology** **11**: 301-307.
- Zeeman, S.C.; Smith, S.M.; Smith, A.M. 2004. The breakdown of starch in leaves. **New Phytologist** **163**: 247-261.

Tabela 1. Teores de carboidratos não estruturais e lignina (mg/g) nos colmos das 3 espécies nativas de *Saccharum*.

Espécie	Amido	Carboidratos solúveis	Lignina solúvel	Lignina insolúvel
<i>S. angustifolium</i>	19,73±1,75 ^b	49,41±6,25 ^b	6,08±0,60 ^a	65,55±2,29 ^b
<i>S. asperum</i>	17,55±0,80 ^a	74,82±4,60 ^c	7,27±1,23 ^a	66,38±2,34 ^b
<i>S. villosum</i>	16,48±1,50 ^a	62,48±11,65 ^a	7,13±1,49 ^a	59,33±6,58 ^a

Médias e desvios-padrões; letras diferentes em uma mesma coluna significam diferenças ao nível de 5%.



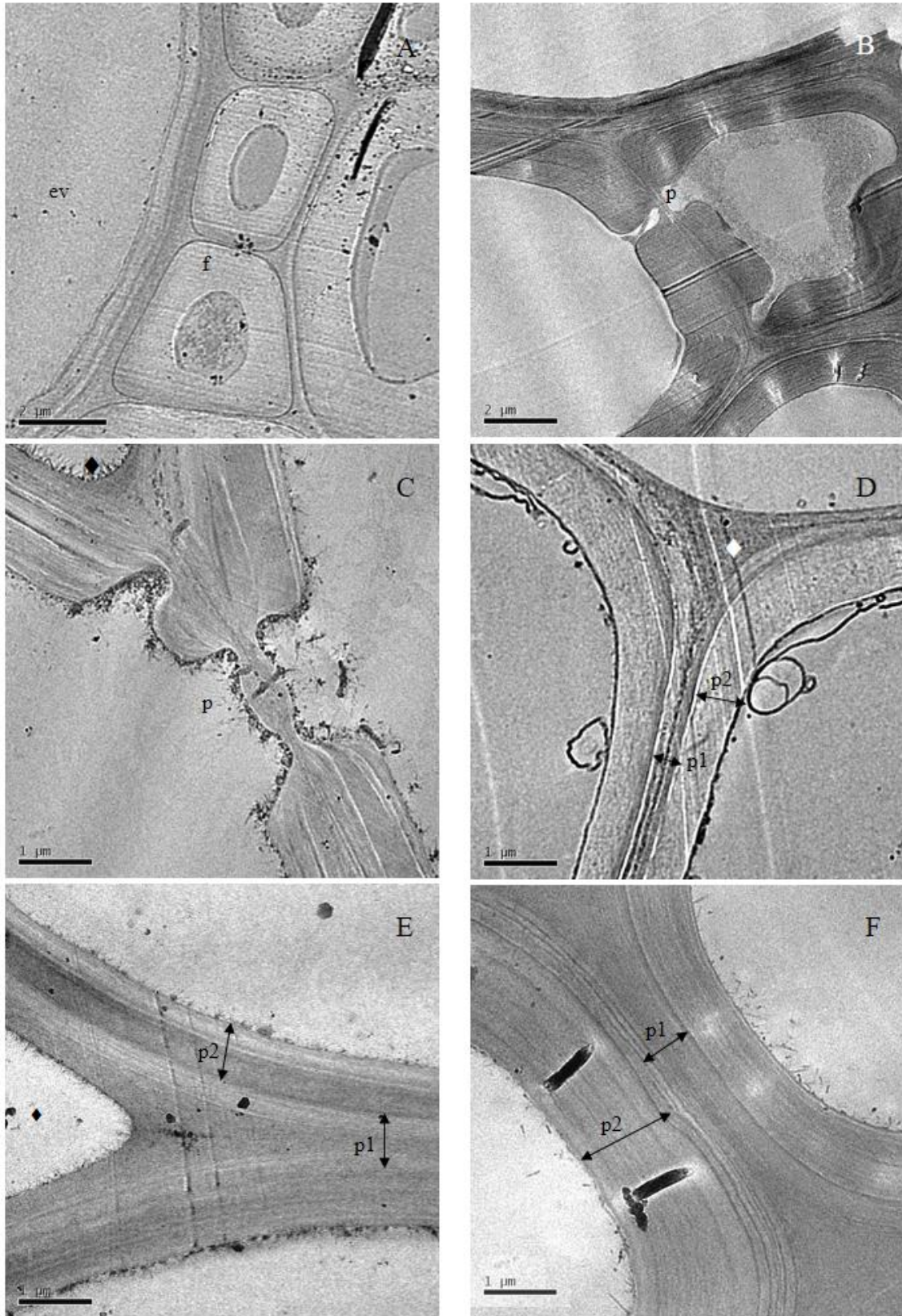


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura; *S. villosum* (A, D, G); *S. angustifolium* (B, E, H) e *S. asperum* (C, F, I). (A, B, C) Superfície da epiderme dos colmos mostrando complexos estomáticos (ce), células longas (cl), células silicificadas (cs), espinho (e), gancho (g) e macrotricoma (ma). (D, E, F) Análise dos campos anteriores com coletor de raios-X, a intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de silício. (G, H, I) Respective gráficos obtidos com a quantificação do elemento silício (Si).

Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão; *S. villosum* (A, F); *S. asperum* (B, C, E) e *S. angustifolium* (D). (A) Região do feixe vascular mostrando elemento de vaso (ev) e fibras (f). (B) Pontoação (p) entre duas fibras. (C) Detalhe da pontoação (p) e espaço intercelular (♦) sem conteúdo aparente. (D) Parede celular primária (p1) com lamela média correspondendo à linha escura mais elétron densa, parede celular secundária (p2) e espaço intercelular preenchido. (E) Parede celular primária e secundária, esta com estratificação clara e escura correspondendo a diferentes arranjos das microfibrilas de celulose, e espaço intercelular sem conteúdo aparente. (F) Parede celular primária e secundária, esta com espessura considerável.

8. CAPÍTULO 4*

*Para este capítulo seguiram-se as normas do periódico Scientia Agricola.

Silvia Dias da Costa Fernandes

Anatomia e bioquímica dos colmos de duas cultivares brasileiras de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* spp.).

RESUMO: Devido à sua posição de destaque na economia global, a cultura da cana-de-açúcar é constantemente estudada em programas de melhoramento e a anatomia vegetal é usada por melhoristas para o desenvolvimento desta cultura, sendo útil às práticas agronômicas. Este estudo teve como objetivo investigar as estruturas anatômicas e verificar os teores de carboidratos não estruturais, lignina e silício nos colmos de duas cultivares brasileiras de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* spp., RB 86-7515 e SP 79-1011), relacionando os resultados com características agronômicas. Foram feitas lâminas de amostras paradérmicas e secções transversais para comparar as medidas dos diferentes tipos celulares da epiderme e espessura dos tecidos, bem como análises em microscopia eletrônica de transmissão e varredura. As diferenças anatômicas e bioquímicas entre as cultivares podem explicar características relacionadas à produtividade e que são vantajosas para a cultura. RB 86-7515 destaca-se em relação a SP 79-1011 pelas paredes espessadas das células epidérmicas, maior densidade de feixes vasculares, alta quantidade de silício, maior concentração de lignina insolúvel e de carboidratos solúveis, confirmando pelos resultados obtidos, o maior uso da cultivar RB 86-7515 nos canaviais brasileiros.

Palavras-chave: *Saccharum*, variedades, carboidratos não estruturais, lignina, silício

Introdução

As espécies de *Saccharum* L. envolvidas no desenvolvimento das atuais cultivares de cana-de-açúcar são originárias do sudeste da Ásia, foram introduzidas no Brasil no século XVI e, desde então, esta cultura tem sido importante para a economia do país, seu maior produtor (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). Trata-se de uma das mais importantes culturas no Brasil, podendo ser usada como matéria-prima para diversos produtos, como etanol, que se tornou destaque nos últimos anos devido ao seu uso como combustível renovável (Ravaneli et al., 2006).

Devido à sua posição de destaque na economia global, esta cultura está constantemente em programas de melhoramento, que têm como objetivo introduzir características de interesse agrônomo. O sucesso da produtividade está ligado ao desenvolvimento de cultivares adaptadas a diferentes regiões, a fim de superar os

problemas ligados a ataque de pragas e resistência a doenças, além de melhorar suas características industriais. Além da proporção de carboidratos não estruturais, substâncias de maior interesse nesta cultura, e de compostos relacionados à resistência vegetal, como lignina e silício, a compreensão acerca da anatomia vegetal é útil às práticas na agricultura, especialmente para a propagação vegetativa, adaptação ambiental e defesa contra patógenos (Silva et al., 2005).

Nassar et al. (2010) também afirmaram que o estudo anatômico é uma ferramenta utilizada pelos melhoristas para detectar variedades tolerantes à seca ou resistentes a pragas, promovendo o desenvolvimento da cultura; a presença de sílica em órgãos aéreos, por exemplo, pode promover tanto a resistência a patógenos como a redução da transpiração (Epstein, 2009).

Um dos primeiros trabalhos sobre a anatomia de cana-de-açúcar foi de Artschwager (1925), que estudou os órgãos vegetativos de *S. officinarum*, posteriormente outros trabalhos mencionaram a anatomia deste grupo (Metcalf, 1960; Hussain et al., 2004; Evert, 2006), mas não houve aplicação taxonômica ou relação com as características vantajosas para a cultura. Assim, este estudo tem como objetivo investigar as características anatômicas, bem como verificar a estrutura da parede celular, teores de silício, lignina, e carboidratos não estruturais dos colmos de duas cultivares brasileiras de cana-de-açúcar, RB 86-7515 e SP 79-1011, para relacionar com as características de resistência e produção, além de fornecer informações para trabalhos futuros acerca desta cultura.

Material e Métodos

As cultivares escolhidas foram RB 86-7515 e SP 79-1011, ambas pertencem aos grupos mais cultivados no Brasil, além de serem mais antigas e encontradas em muitos canaviais. RB 86-7515 é mais tolerante à ferrugem, em consequência disto, tem sido mais utilizada que SP 79-1011 (Alonso, 2009).

As amostras foram coletadas da área experimental da EMBRAPA Cerrados (Planaltina, DF), sendo que ambas haviam sido plantadas na mesma época e submetidas aos mesmos tratamentos culturais. Foram analisadas as regiões medianas dos 2^o e 3^o entrenós obtidas de cinco indivíduos de cada cultivar. As amostras paradérmicas foram obtidas com solução de Franklin e coradas com azul de metileno 1% (Kraus & Arduin, 1997). As seções transversais foram feitas em micrótomo de mesa, clarificadas e coradas com

azul de alcian e safranina 1% (Luque et al., 1996). As lâminas foram montadas com resina sintética (Paiva et al., 2006).

As fotomicrografias foram feitas em microscópio Olympus CX 31 acoplado a câmera digital. A avaliação quantitativa das estruturas foi feita com o auxílio do programa Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, 2009). Nas amostras parâdermicas foram medidos comprimento e largura dos diferentes tipos celulares, nas secções transversais foram medidos diâmetro total, espessuras da epiderme, exoderme, parênquima cortical, endoderme e calota de esclerênquima dos feixes vasculares, além dos comprimento, largura e densidade dos feixes vasculares centrais.

Para a quantificação dos carboidratos não estruturais e da lignina, amostras frescas de três indivíduos por cultivar foram congeladas e liofilizadas durante 48h, posteriormente foram pulverizadas em moinho de facas até as partículas estarem reduzidas para passarem em peneira de 40 mesh. Os carboidratos solúveis foram extraídos com etanol a 80% a 80°C (três vezes) e determinados pelo método do fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956). O amido foi medido nos peletes obtidos com a extração dos carboidratos solúveis, seguindo o método enzimático descrito por Amaral et al. (2007). O teor de lignina insolúvel foi determinado de acordo com Templeton & Ehrman (1995), e o de lignina solúvel seguiu Ehrman (1996). O conteúdo de cada composto foi calculado em relação à massa seca da amostra.

Usou-se o delineamento inteiramente casualizado. Para cada variável anatômica foi feito um total de 25 repetições, cinco para cada um dos cinco indivíduos por cultivar. Para os teores de carboidratos não estruturais e de lignina foram feitas três repetições para cada um dos três indivíduos por cultivar, totalizando nove repetições. As médias foram comparadas por teste-T ($p \leq 0.05$), usando o programa Statistica 8.0 (Hill & Lewicki, 2007).

Para a microscopia eletrônica, as amostras foram fixadas em Karnovsky (1965). Para a análise de silício nas células epidérmicas, as amostras foram desidratadas em série acetônica, secas ao ponto crítico, cobertas com carbono e expostas ao coletor de raios-X (SDD) EDS acoplado ao microscópio eletrônico de varredura JEOL JEM 840. Para a visualização das paredes celulares das fibras ao redor dos feixes vasculares centrais, as amostras foram contrastadas *in block* com acetato de uranila, desidratadas em série acetônica, infiltradas e inclusas em resina Spurr (Bozzola & Russel 1992),

sendo os cortes ultrafinos (90 nm) examinados em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1011.

Resultados e Discussão

Microscopia óptica

A epiderme do colmo, em vista frontal, é uniforme, não havendo distinção entre zonas costal e intercostal (Figuras 1A-B). Ocorrem células epidérmicas longas, células silicificadas, células suberosas e complexos estomáticos. As células epidérmicas longas apresentam paredes sinuosas, em RB 86-7515 as paredes celulares são mais espessadas, especialmente nas regiões de contato com as células silicificadas. Segundo Evert (2006), paredes mais espessadas nas células epidérmicas são responsáveis pela diminuição da perda hídrica.

RB 86-7515 possui células silicificadas halteriformes, enquanto SP 79-1011 também possui o tipo cruciforme (Figuras 1A-B). De acordo com Prychid et al. (2004), esses tipos celulares ocorrem em folhas de muitos grupos de monocotiledôneas, mas podem ser encontrados em todos os órgãos e podem ter diferentes tamanhos e formatos em espécies distintas.

As células suberosas são maiores que as silicificadas (Tabela 1), em SP 79-1011 são arredondadas e frequentemente isoladas, em RB 86-7515 são retangulares e formam o par sílico-suberoso. Os complexos estomáticos são raros quando comparados aos demais tipos celulares da epiderme, apresentam células-guarda halteriformes e células subsidiárias em cúpula, como descrito por Metcalfe (1960) para as Poaceae (Figuras 1A-B).

As diferenças quantitativas mais significativas entre as epidermes nas duas cultivares foram os comprimentos de todos os tipos celulares, que são maiores em RB 86-7515 (Tabela 1). Este resultado reflete a descrição das cultivares de cana-de-açúcar feita por Arizono et al. (2000), visto que SP 79-1011 é classificada como portadora de entrenós curtos e RB 86-7515 possui entrenós longos. Assim, o maior comprimento das células na epiderme está provavelmente relacionado ao comprimento dos entrenós, o que também foi verificado em trigo, cujos colmos de cultivares altas geralmente continham as células epidérmicas mais longas (Nilson et al., 1957). Beemster et al. (2002) confirmam que a principal causa do aumento do órgão é a expansão celular, uma

vez que um aumento na divisão celular contribuiria com células menores, não ocasionado crescimento global.

Além de apresentarem diferenças no comprimento dos tipos celulares da epiderme (Tabela 1), RB 86-7515 e SP 79-1011 diferem nos formatos e distribuições das células silicificadas e suberosas. Resultados semelhantes foram encontrados por Roth (1968) quando analisou as estruturas epidérmicas em colmos de cultivares de cana-de-açúcar da África do Sul, valor diagnóstico foi atribuído a comprimento e largura das células epidérmicas longas; ocorrência, tamanho e formato das células suberosas; quantidade e tamanho das células silicificadas.

Em secção transversal os colmos são circulares e sólidos, apresentando epiderme, córtex e sistema vascular (Figuras 1C-D), o que é padrão para muitas Poaceae (Metcalf, 1960). A epiderme apresenta uma única camada de células coberta por cutícula delgada e sem ornamentação (Figuras 1E-F). As células epidérmicas comuns apresentam paredes espessadas e lignificadas, tanto que eventualmente não há lúmen celular (Figuras 1E-F), o que reduz a transpiração apenas ao nível dos estômatos (Evert, 2006) e minimiza o ataque de pragas (Keeping & Rutherford, 2004).

O córtex compreende exoderme, células parenquimáticas e endoderme (Figuras 1E-F). A exoderme é composta por uma única camada de células de diferentes formatos e tamanhos com espessamento de parede em U, este espessamento é interrompido quando há complexo estomático adjacente. O parênquima cortical abaixo da exoderme forma dois tecidos distintos: parênquima fundamental com células isodiamétricas e paredes espessadas que preenchem os espaços intercelulares; e parênquima clorofiliano também com células isodiamétricas, mas com volumes maiores, paredes mais delgadas e pequenos espaços intercelulares. A endoderme é composta por uma única camada de células que formam um arco que envolve o sistema vascular, como observado por Hussain et al. (2004).

O sistema vascular compreende feixes vasculares colaterais imersos aleatoriamente em tecido parenquimático (Figuras 1C-D). Os feixes vasculares são circundados por duas bainhas esclerenquimáticas completas, as células parenquimáticas próximas à bainha são menores e as respectivas paredes são mais espessadas que as demais células parenquimáticas do sistema vascular (Figuras 1G-H). Da periferia em direção à região central, a densidade dos feixes vasculares e o espessamento das paredes das células parenquimáticas diminuem, enquanto o tamanho dos feixes vasculares e o

volume das células parenquimáticas aumentam, este padrão de distribuição e tamanho também foi encontrado por Hussain et al. (2004).

Diferenças quantitativas foram encontradas nas secções transversais das duas cultivares (Tabela 1). A espessura da exoderme e do parênquima cortical foi maior em SP 79-1011, enquanto a densidade dos feixes vasculares e a espessura da calota de fibras nesses feixes foram maiores em RB 86-7515. Essas diferenças anatômicas nos colmos podem ocorrer devido a adaptações à seca, sendo citadas por Nassar et al. (2010) em relação à espessura dos tecidos periféricos e densidade de fibras, e por Hameed et al. (2010) em relação às espessuras da exoderme e do parênquima cortical e ao número de feixes vasculares. O que reflete que ambas as cultivares são resistentes à seca (Arizono et al., 2000), mas devido a estruturas anatômicas distintas.

As células que circundam os feixes vasculares são diferentes entre as cultivares, RB 86-7515 apresenta mais células na calota do protoxilema, com paredes mais espessadas quando comparadas a SP 79-1011, que é uma cultivar suscetível à broca (*Diatraea* spp.) (Arizono et al., 2000). Keeping & Rutherford (2004) afirmaram que um dos mecanismos de resistência da cana-de-açúcar a insetos é o espessamento das paredes celulares. Portanto, a presença de maior densidade de feixes vasculares e o maior número de células com espessamento de parede em RB 86-7515, provavelmente confere maior resistência à broca comparada a SP 79-1011.

Segundo Dinardo-Miranda et al. (2011), a broca causa perdas significativas por unidade de área, devido à sua ampla distribuição nos canaviais brasileiros. Além de abrir galerias nos colmos, causando perda de peso e morte dos brotos, perdas indiretas também ocorrem porque as aberturas permitem a entrada de fungos. Devido à ampla distribuição deste inseto, é muito importante que os programas de melhoramento tenham como objetivo a melhoria da resistência das cultivares.

Silício

Em vista frontal, sob microscopia eletrônica de varredura, é possível visualizar as células silicificadas e demais tipos celulares, como os complexos estomáticos em maior detalhamento (Figuras 2A, D).

Nas duas cultivares de cana-de-açúcar, a distribuição de silício não é uniforme, podendo estar presente principalmente nas células silicificadas, mas também nas células-guarda e subsidiárias (Figuras 2B, E). Sakai & Sanford (1984) analisando

cultivares de cana-de-açúcar, também verificaram silício em diferentes tipos celulares nas folhas, inclusive nos macro e microtricomas, fato que não pode ser observado aqui, uma vez que nos colmos das cultivares analisadas, não há tricomas.

O silício é absorvido pelas raízes na forma de ácido monossilícico, seu transporte é via xilema e pode ser regulado pela transpiração, sendo depositado principalmente nas paredes das células da epiderme (Rodrigues et al., 2011). Motomura et al. (2000) afirmam que vários fatores estão associados à deposição de silício nas plantas, como pH e disponibilidade de nutrientes no solo. Apesar da comprovada influência ambiental, mesmo em condições de cultivo semelhantes, a cultivar RB 86-7515 apresentou maior quantidade de silício que a SP 79-1011 (Figuras 2C e F).

A acumulação de silício em diversas culturas pode resultar em aumento da produtividade provavelmente devido à redução da transpiração e aumento da resistência a doenças e pragas (Braga et al., 2009) e ao acamamento (Rodrigues et al., 2011). Além disso, Reynolds et al. (2009) verificaram que a ação do silício sobre os insetos herbívoros pode gerar desgaste da mandíbula, redução no crescimento e na reprodução desses insetos, efeitos associados à redução dos danos para a cultura. Assim, a cultivar RB 86-7515 apresenta, além do espessamento de suas paredes, uma outra estratégia que é a maior quantidade de silício na epiderme de seu colmo, características relacionadas a resistências a pragas e ao acamamento.

Paredes celulares

As paredes celulares podem variar muito em relação a suas composições e propriedades físicas, dependendo do tipo de célula e das espécies de plantas (Souza et al., 2010). No entanto, todas as plantas possuem uma composição básica semelhante nas suas paredes celulares, microfibrilas de celulose dispostas em uma matriz, que é composta principalmente de polissacarídeos não celulósicos com uma variedade de estruturas diferentes, como proteínas estruturais, glicoproteínas, e compostos fenólicos, incluindo a lignina (Harris & Smith, 2006).

Independente da complexidade dos tipos de parede, dois tipos são reconhecidos, primária e secundária. A parede primária é relativamente não especializada e é similar na arquitetura molecular em todos tipos de células, embora a sua ultraestrutura possa variar amplamente. A parede celular secundária se deposita geralmente após a parada do

crescimento, podendo se tornar altamente especializada na estrutura e composição, refletindo o estado diferenciado da célula (Mauseth, 1988).

A observação da parede celular das fibras adjacentes aos elementos de vaso do metaxilema das cultivares de cana-de-açúcar sob microscopia eletrônica de transmissão, permitiu verificar a comunicação via pontuações, espaço intercelulares sem conteúdo aparente, além de distinguir as camadas correspondentes a parede primária e parede secundária, esta última com distinção de camadas adicionais (Figuras 3A-B). De acordo com Gritsch & Murph (2005), nas paredes secundárias estruturais pode haver número distinto de camadas que diferem entre si pela composição química, mas principalmente pela orientação das microfibrilas de celulose, sendo que esta estrutura laminada aumenta sensivelmente a resistência dessas paredes.

As camadas adicionais de parede secundária foram observadas em ambas as cultivares, mas são mais espessas em RB 86-7515 (Figura 3B). Cesarino et al. (2012) verificaram que em cana-de-açúcar a espessura da parede secundária das fibras é diretamente proporcional ao grau de maturação, entretanto, todas as amostras foram padronizadas, retiradas dos 2º e 3º entrenós de indivíduos cultivados em mesma época. Assim, nossos resultados se aproximam dos encontrados por Emons & Mulder (2000), que afirmam que o padrão formado pelas microfibrilas de celulose nas paredes, além de ser específico do tipo celular e do estágio de desenvolvimento, é variável entre espécies.

Segundo Gritsch & Murphy (2005), um dos principais determinantes das propriedades de resistência dos colmos é a quantidade de camadas múltiplas nas paredes secundárias, que se dá devido a alternância da orientação das microfibrilas de celulose. Desta maneira, como RB 86-7515 (Figura 3B) apresenta maior espessura nas paredes secundárias das fibras, possui maior resistência quando comparada a SP 79-1011 (Figura 3A).

Carboidratos não estruturais e lignina

Os colmos das duas cultivares de cana-de-açúcar apresentam baixa concentração de amido em comparação à concentração dos carboidratos solúveis, não havendo diferença significativa entre elas (Tabela 2). Esta baixa concentração é interessante, pois, de acordo com Figueira et al. (2011), a presença de amido nos colmos de cana-de-açúcar promove a perda ou a produção ineficiente em usinas de açúcar, já que aumenta a viscosidade, inibe a cristalização e representa perda de sacarose no melaço.

RB 86-7515 apresenta maior concentração de carboidratos solúveis (Tabela 2), sendo caracterizada pelo alto teor de sacarose (Picoli et al., 2012), comprovando afirmação de Figueira et al. (2011), que a elevada concentração de açúcares solúveis nos colmos de cana-de-açúcar é principalmente devido à alta proporção de sacarose.

A lignina compreende uma porção substancial da parede celular secundária das gramíneas e essencialmente preenche os poros entre os polissacarídeos (Vogel, 2008). Silva et al. (2005) afirmam que cultivares da mesma espécie apresentam incrementos de lignina diferenciados, o que influencia na resistência do vegetal, podendo proporcionar um aumento na estabilidade das paredes à ação de enzimas degradadoras e impedir a atuação de patógenos.

SP 79-1011 apresenta maior quantidade de lignina solúvel, no entanto, seu teor de lignina insolúvel foi menor (Tabela 2). Visto que a maior proporção de lignina no vegetal é a caracterizada como insolúvel, RB 86-7515 pode ser classificada como a maior detentora de lignina e, conseqüentemente, a cultivar mais resistente em nível de estabilidade das paredes celulares. Uma das desvantagens de SP 79-1011 é a quebra dos ponteiros (Arizono et al., 2000), que pode ser devido a menor proporção de fibras ou a menor taxa de lignificação das paredes celulares.

Conclusão

As diferenças anatômicas e bioquímicas entre as cultivares RB 86-7515 e SP 79-1011 podem explicar características relacionadas à produtividade e vantajosas para a cultura. RB 86-7515 destaca-se em relação a SP 79-1011, em diversos aspectos: maior concentração de carboidratos solúveis; maior espessamento nas paredes das células epidérmicas e alta densidade de feixes vasculares, contribuindo para a redução da perda hídrica; alta proporção de silício principalmente em células silicificadas mais longas, proporcionando resistência a fungos e insetos; e paredes secundárias mais espessas com maior concentração de lignina insolúvel, promovendo resistência a pragas e ao acamamento.

Como as cultivares estavam sob as mesmas condições ambientais, mais estudos são necessários para determinar quais estruturas permanecem estáveis mesmo em diferentes ambientes, e assim, consideradas interessantes para o melhoramento.

Agradecimentos

À EMBRAPA Cerrados por fornecer as amostras vegetais. Aos laboratórios da Universidade de Brasília - microscopia eletrônica pelo uso dos microscópios, ecologia pelo uso do moinho de facas, bioquímica vegetal pelo uso dos equipamentos para as análises dos carboidratos não estruturais. Ao laboratório de produtos florestais do IBAMA pelo uso dos equipamentos para as análises de lignina.

Referências

- Alonso, A.O. 2009. X-ray of sugarcane: census reveals more cultivated varieties. *Revista Canavieiros* 39: 20-21. (in Portuguese).
- Amaral, L.I.V.; Gaspar, M.; Costa, P.M.F.; Aidar, M.P.M.; Buckeridge, M.S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração de amido em materiais vegetais. ***Hoehnea* 34(4): 425-431.**
- Arizono, H.; Gheller, A.C.A.; Masuda, Y.; Hoffmann, H.P.; Bassinello, A.I.; Giglioti, E.A.; Menezes, L.L.; Matsuoka, S. 2000. Guide of the main sugarcane varieties. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil. (in Portuguese).
- Artschwager, E. 1925. Anatomy of vegetative organs of sugar cane. *Journal of Agricultural Research* 30(3): 197-241.
- Beemster, G.T.S.; Vusser, K.; Tavernier, E.; Bock, K.; Inzé, D. 2002. Variation in growth rate between *Arabidopsis* ecotypes is correlated with cell division and A-type cyclin-dependent kinase activity. *Plant Physiology* 129(2): 854-864.
- Bozzola, J.J.; Russel, L.D. 1992. **Electron microscopy principles and techniques for biologists.** Boston, Ma. Ed. Jones & Bartlett.
- Braga, F.T.; Nunes, C.F.; Favero, A.C.; Pasqual, M.; Carvalho, J.G.; Castro, E.M. 2009. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44: 128-132.**
- Cesarino, I.; Araújo, P.; Mayer, J.L.S.; Leme, A.F.P.; Mazzafera, P. 2012. Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development. ***Plant Physiology and Biochemistry* 55: 66-76.**
- Cheavegatti-Gianotto, A.; Couto de Abreu, H.M.; Arruda, P.; Bessalho Filho, J.C.; Burnquist, W.L.; Creste, S.; di Ciero, L.; Ferro, J.A.; Figueira, A.V.O.; Filgueiras, T.S.; Grossi-de-Sá, M.F.; Guzzo, E.C.; Hoffmann, H.P.; Landell, M.G.A.; Macedo, N.; Matsuoka, S.; Reinach, F.C.; Romano, E.; Silva, W.J.; Silva Filho, M.C.; Ulian, E.C.

2011. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology* 4: 62-89.
- Dinardo-Miranda, L.L.; Fracasso, J.V.; Perecin, D. 2011. Spatial variability of *Diatraea saccharalis* populations in sugarcane fields and suggestion of sampling method. *Bragantia* 70(3): 577-585. (in Portuguese, with abstract in English).
- Dubois, M.; Gilles, A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. ***Analytical Chemistry* 28**: 350-355.
- Ehrman, T. 1996. **Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass**. NREL ethanol project. Laboratory Analytical Procedure (LAP 004). Golden, CO.
- Emons, A.M.C.; Mulder, B.M. 2000. How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. *Trends in Plant Science* 5(1): 35-40.
- Epstein, E. 2009. Silicon: its manifold roles in plants. *Annals of Applied Biology* 155: 155-160.
- Evert, R.F. 2006. *Esau's plant anatomy: Meristems, cells, and tissues of the plant body – their structure, function and development*. A John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Figueira, J.A.; Carvalho, P.H.; Sato, H.H. 2011. Sugarcane starch: quantitative determination and characterization. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos* 31(3)**: 806-815.
- Gritsch, C.S.; Murphy, R.J. 2005. Ultrastructure of fiber and parenchyma cell walls during early stages of culm development in *Dendrocalamus asper*. ***Annals of Botany* 95**: 619-629.
- Hameed, M.; Ashraf, M.; Naz, N.; Al-Qurainy, F. 2010. Anatomical adaptations of *Cynodon dactylon* (L.) Pers., from the salt range Pakistan, to salinity stress. I. Root and stem anatomy. *Pakistan Journal of Botany* 42: 279-289.
- Harris, P.J.; Smith, B.G. 2006. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. ***International Journal of Food Science and Technology* 41(2)**: 129-143.
- Hill, T.; Lewicki, P. 2007. *Statistics: methods and applications*. StatSoft, Tulsa, OK USA.

- Hussain, A.; Khan, Z.I.; Ghafoor, M.Y.; Ashraf, M.; Parveen, R.; Rashid, M.H. 2004. Sugarcane, sugar metabolism and some abiotic stresses. *International Journal of Agriculture & Biology* 6: 732-742.
- Karnovskyy, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. ***Journal of Cell Biology*** 27: 137-138.
- Keeping, M.G.; Rutherford, R.S. 2004. Resistance mechanisms of south African sugarcane to the stalk borer *Eldana saccharina* (Lepidoptera:Pyralidae): a review. *Proceedings of the South African Sugar Technologists Association* 78: 307-312.
- Kraus, J.E.; Arduim, M. 1997. Basic Manual of methods in plant morphology. EDUR, Seropédica, RJ, Brazil. (in Portuguese).
- Luque, R.; Sousa, H.C.; Kraus, J.E. 1996. Staining methods of modified Roeser (1972) and Kropp (1972), aiming at substituting the astra blue by alcian blue 8GS or 8GX. *Acta Botanica Brasilica* 10: 199-212. (in Portuguese, with abstract in English).
- Mauseth, J.D. 1988. *Plant anatomy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, CA. 560 pp.
- Media Cybernetics. 2009. Image pro-plus, 7.0 for windows. Silver Spring, MD, USA.
- Metcalf, C.R. 1960. *Anatomy of the monocotyledons: I Gramineae*. Clarendon Press, New York, NY, USA.
- Motomura, H.; Fujii, T.; Suzuki, M. 2000. Distribution of silicified cells in the leaf blades of *Pleioblastus chino* (Franchet et Savatier) Makino (Bambusoideae). ***Annals of Botany*** 85: 751-757.
- Nassar, N.M.A.; Abreu, L.F.A.; Teodoro, D.A.P.; Graciano-Ribeiro, D. 2010. Drought tolerant stem anatomy characteristics in *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) and a wild relative. *Genetics and Molecular Research* 9: 1023-1031.
- Nilson, E.B.; Johnson, V.A.; Gardner, C.O. 1957. Parenchyma and epidermal cell length in relation to plant height and culm internode length in winter wheat. *Botanical Gazette* 119(1): 38-43.
- Paiva, J.G.A.; Fank-de-Carvalho, S.M.; Magalhães, M.P.; Graciano-Ribeiro, D. 2006. Verniz vitral incolor 500®: a mounting medium alternative and economically viable. *Acta Botanica Brasilica* 20: 257-264. (in Portuguese, with abstract in English).
- Picoli, M.C.A.; Lamparelli, R.A.; Sano, E.E.; Rocha, J.V. 2012. Imagens multipolarizadas do sensor Palsar/Alos na discriminação das fases fenológicas da cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47(9): 1307-1316.

- Prychid, C.J.; Rudall, P.J.; Gregory, M. 2004. Systematics and biology of silica bodies in monocotyledons. *The Botanical Review* 69: 377-440.
- Ravaneli, G.C.; Madaleno, L.L.; Presotti, L.E.; Mutton, M.A.; Mutton, M.J.R. 2006. Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. *Scientia Agricola* 63(6): 534-539.
- Reynolds, A.G.; Keeping, M.G.; Meyer, J.H. 2009. Silicon-augmented resistance of plants to herbivorous insects: a review. ***Annals of Applied Biology* 155**: 171-186.
- Rodrigues, F.A.; Oliveira, L.A.; Korndörfer, A.P.; Korndörfer, G.H. 2011. Silício: um elemento benéfico e importante para as plantas. *Informações Agronômicas* 134: 14-20.
- Roth, G. Anatomical differences in the stem epidermal structure of sugarcane varieties grown in South Africa. 1968. *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association*: 116-123.
- Sakai, W.S.; Sanford, W.G. 1984. A developmental study of silification in the abaxial epidermal cells of sugarcane leaf blades using scanning electron microscopy and energy dispersive x-ray analysis. *American Journal of Botany* 71: 1315-1322.
- Silva, L.M.; Alquini, Y.; Cavallet, V.J. 2005. Interrelations between plant anatomy and plant production. *Acta Botanica Brasilica* 19(1): 183-194. (in Portuguese, with abstract in English).
- Souza, A.; Sandrin, C.Z.; Caliό, M.F.A.; Meirelles, S.T.; Pivello, V.R.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2010. Seasonal variation of soluble carbohydrates and starch in *Echinochaena inflexa*, a native grass species from the Brazilian savanna, and in the invasive grass *Melinis minutiflora*. ***Brazilian Journal of Biology* 70(2)**: 395-404.
- Templeton, D.; Ehrman, T. 1995. **Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass** NREL ethanol project. Laboratory Analytical Procedure (LAP 003). Golden, CO.
- Vogel, J. 2008. Unique aspects of the grass cell wall. ***Current Opinion in Plant Biology* 11**: 301-307.

Tabela 1. Análise comparativa das medidas anatômicas dos colmos das cultivares RB 86-7515 e SP 79-1011.

	RB 86-7515	SP 79-1011
Comprimento das células longas (μm)	85.29 \pm 10.40 ^a	53.95 \pm 9.16 ^b
Largura das células longas (μm)	9.82 \pm 1.81 ^a	9.10 \pm 1.82 ^a
Comprimento dos complexos estomáticos (μm)	30.96 \pm 1.32 ^a	28.62 \pm 1.67 ^b
Largura dos complexos estomáticos (μm)	16.56 \pm 1.95 ^a	17.94 \pm 1.39 ^a
Comprimento das células silicificadas (μm)	11.85 \pm 1.84 ^a	8.83 \pm 1.85 ^b
Largura das células silicificadas (μm)	5.55 \pm 1.29 ^a	6.47 \pm 1.28 ^a
Comprimento das células suberosas (μm)	17.91 \pm 3.38 ^a	10.91 \pm 2.45 ^b
Largura das células suberosas (μm)	10.51 \pm 1.72 ^a	10.93 \pm 1.99 ^a
Espessura total (μm)	3347.25 \pm 109.03 ^a	3015.64 \pm 171.21 ^a
Espessura da epiderme (μm)	9.84 \pm 0.89 ^a	9.65 \pm 1.29 ^a
Espessura da exoderme (μm)	9.37 \pm 1.53 ^a	12.47 \pm 2.23 ^b
Espessura do parênquima cortical (μm)	33.81 \pm 15.92 ^a	49.62 \pm 18.04 ^b
Espessura da endoderme (μm)	20.48 \pm 3.17 ^a	20.77 \pm 2.83 ^a
Comprimento dos feixes vasculares (μm)	109.07 \pm 26.68 ^a	116.53 \pm 24.88 ^a
Largura dos feixes vasculares (μm)	109.81 \pm 25.83 ^a	124.58 \pm 27.29 ^a
Densidade dos feixes vasculares (no./mm ²)	18.84 \pm 5.47 ^a	13.00 \pm 5.56 ^b
Espessura da calota de fibras (μm)	114.63 \pm 24.17 ^a	87.87 \pm 25.74 ^b

Média \pm desvio-padrão. Linhas com letras diferentes significam diferenças ao nível de 5% (teste-T, $p < 0.05$).

Tabela 2. Teores de carboidratos não estruturais e lignina (mg/g) nos colmos das cultivares RB 86-7515 e SP 79-1011.

Cultivar	Amido	Carboidratos solúveis	Lignina solúvel	Lignina insolúvel
RB 86-7515	16,38 \pm 1.43 ^a	757.27 \pm 121.62 ^a	6.36 \pm 0.20 ^a	35.01 \pm 0.18 ^a
SP 79-1011	15.26 \pm 1.99 ^a	602.65 \pm 94.69 ^b	7.16 \pm 0.02 ^b	28.62 \pm 0.89 ^b

Média \pm desvio-padrão. Letras diferentes em uma mesma coluna significam diferenças ao nível de 5% (teste-T, $p < 0.05$).

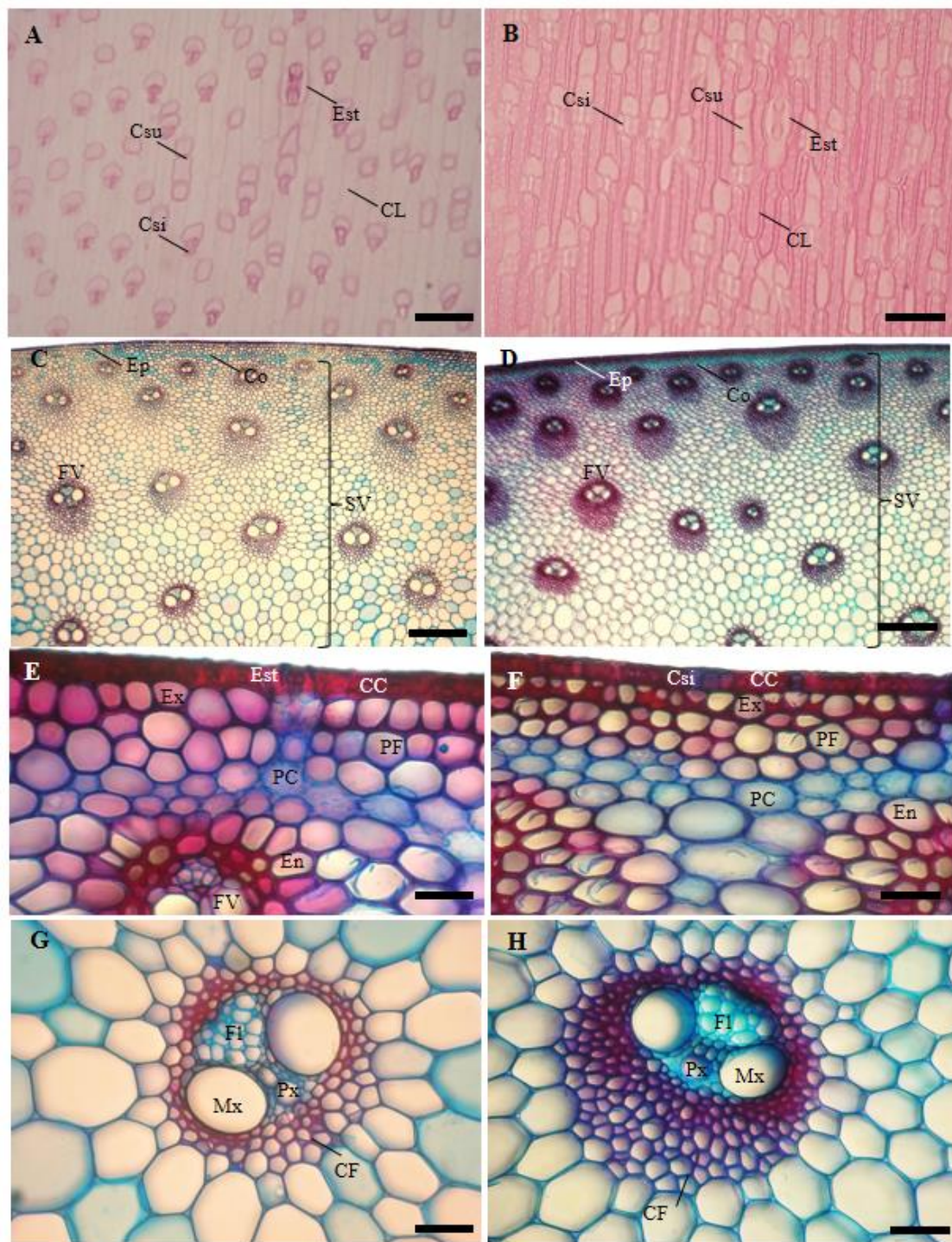


Figura 1. Microscopia óptica, amostras paradérmicas de SP 79-1011 (A) e RB 86-7515 (B), secções transversais de SP 79-1011 (C, E, G) e RB 86-7515 (D, F, H). Nota-se maior espessamento de parede nas células da epiderme e maior quantidade de fibras na calota dos feixes vasculares em RB 86-7515. CC = célula epidérmica comum; CL = célula longa; Co = córtex; Csi = célula silicificada; Csu = célula suberosa; CF = calota de fibras; En = endoderme; Ep = epiderme; Est = complexo estomático; Ex = exoderme; Fl = floema; FV = feixe vascular; Mx = elemento de vaso do metaxilema; PC = parênquima clorofiliano; PF = parênquima fundamental; Px = elemento de vaso do protoxilema; SV = sistema vascular. A barra corresponde a 28µm (A-B), 150µm (C-D), 67µm (E-F), 28µm (G-H).

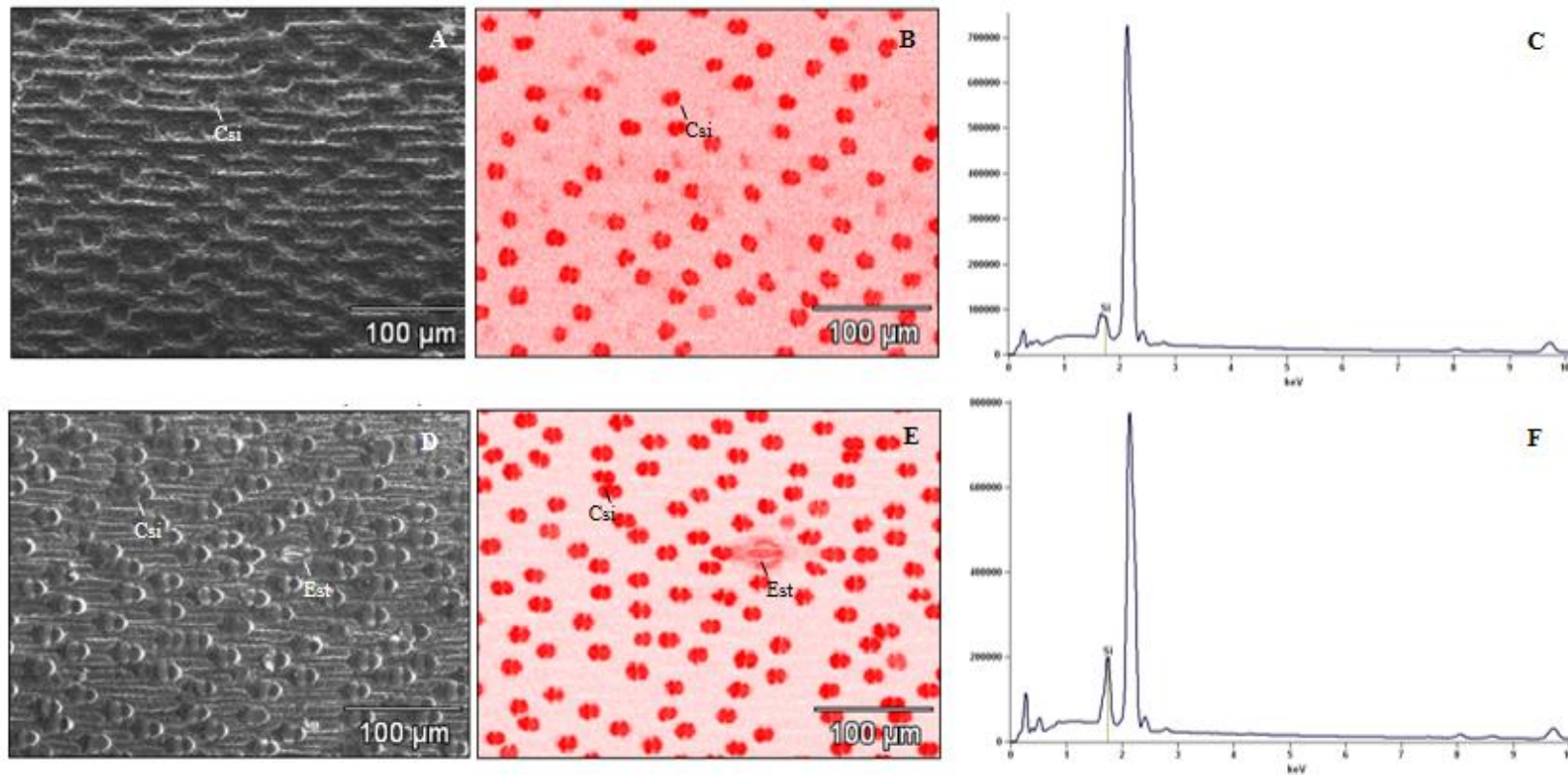


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de SP 79-1011 (A, B, C) e RB 86-7515 (D, E, F). Na análise dos campos com coletor de raios-X, a intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de silício (B, E), C e F são os respectivos gráficos obtidos com a quantificação do elemento silício (Si). Csi = célula silicificada; Est = complexo estomático.

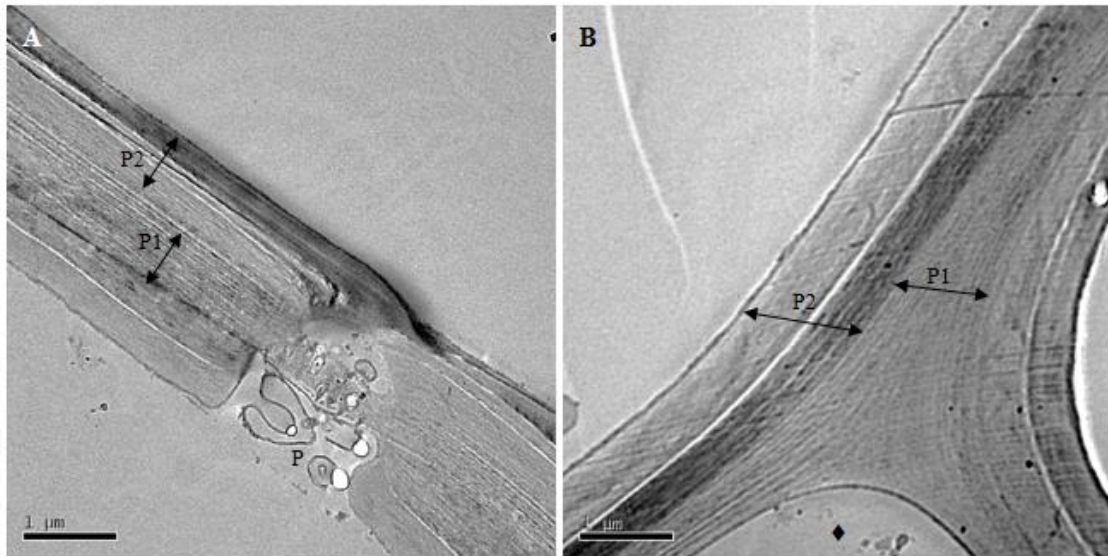


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão de SP 79-1011 (A) e RB 86-7515 (B). Ocorrem parede celular primária e secundária, esta com estratificação clara e escura correspondendo a diferentes arranjos de microfibrilas de celulose. P = pontoação; P1 = parede celular primária; P2 = parede celular secundária; ◆ = espaço intercelular.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados e discussões apresentados nos capítulos desta tese permitem as seguintes conclusões:

- *Saccharum villosum* é a espécie que apresenta maior diversidade anatômica no colmo, as diferenças observadas não estão relacionadas com a localização geográfica de cada população. Novos trabalhos taxonômicos devem ser feitos no “complexo *Saccharum villosum*” para melhor delimitar a circunscrição da espécie;

- não foi possível encontrar características distintas e diagnósticas para cada uma das três espécies de *Saccharum*, as principais diferenças são relacionadas às medidas morfológicas e anatômicas;

- é sugerida a descrição de uma espécie nova inédita de *Saccharum*, o que será feito em trabalhos posteriores com o Dr. Tarciso de Sousa Filgueiras;

- as três espécies nativas de *Saccharum* apresentam características compartilhadas com as cultivares de cana-de-açúcar, como baixas proporções de amido e lignina solúvel. No entanto, as espécies nativas possuem menor proporção de açúcares solúveis e maior proporção de lignina insolúvel;

- *Saccharum villosum* apresenta a maior quantidade de características desejáveis para melhoria da cultura da cana-de-açúcar, como espessura da parede secundária das fibras, baixos teores de amido e lignina insolúvel e maior teor de carboidratos solúveis quando comparada com as demais espécies nativas.