



ANA CATARINA LIMA DE OLIVEIRA

**ANATOMIA E CITOMETRIA DE FLUXO EM
CANA-DE-AÇÚCAR**

LAVRAS - MG

2013

ANA CATARINA LIMA DE OLIVEIRA

ANATOMIA E CITOMETRIA DE FLUXO EM CANA-DE-AÇÚCAR

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Oliveira, Ana Catarina Lima de.
Anatomia e citometria de fluxo em cana-de-açúcar / Ana Catarina
Lima de Oliveira. – Lavras: UFLA, 2013.
92 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.
Orientador: Moacir Pasqual.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar - Conteúdo de DNA. 2. Cana-de-açúcar -
Histologia. 3. Citômetro. 4. Poaceae. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 584.9204

ANA CATARINA LIMA DE OLIVEIRA

ANATOMIA E CITOMETRIA DE FLUXO EM CANA-DE-AÇÚCAR

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 03 de setembro de 2013.

Dr. Adriano Teodoro Bruzi	UFLA
Dra. Cynthia de Oliveira	UFLA
Dra. Leila Aparecida Salles Pio	UFLA
Dra. Maria de Fátima Arrigoni-Blank	UFS

Dr. Moacir Pasqual
Orientador

LAVRAS – MG

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus que, nos momentos mais difíceis, estendeu suas mãos, dando-me força e incentivo para eu continuar esta caminhada com a certeza de nunca estar sozinha.

A minha família: meus pais, Antonio e Silene, e minhas irmãs, Aline e Carol, por todo o apoio, incentivo, amor e pela prontidão que sempre tiveram quando eu precisei. Vocês são a razão da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realizar o doutorado e, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Ao meu orientador, professor Moacir Pasqual, pela confiança, pelos ensinamentos, pela valiosa orientação e, em especial, por seu apoio, pelas oportunidades e pelo seu exemplo de pessoa e de profissional.

Ao professor Adriano Bruzi, por aceitar participar da banca avaliadora, ceder grande parte do material para a realização dos experimentos e coorientação neste trabalho.

À Dra. Cynthia de Oliveira, por aceitar participar da banca avaliadora.

À Leila Aparecida Salles Pio, por aceitar participar da banca avaliadora e por ter se tornado uma verdadeira amiga. Obrigada por me acompanhar ao longo deste trabalho, pelo carinho, amizade, auxílio, dedicação e ensinamentos.

Ao meu melhor amigo e namorado, Dênio, por entender os meus finais de semana sem tempo, meus dias curtos, meu sono constante, pela paciência e serenidade que me passou ao longo deste trabalho. Ao seu lado tudo é mais fácil. Muito obrigada. Te amo! Agradeço também à sua família, por todo o carinho!

Às minhas eternas companheiras de república, Dalíhcia, Thaís e Lucília, obrigada pelo acolhimento e pela amizade. Serei sempre grata.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos que se tornaram verdadeiros amigos: Rafael, Claudinéia, Verônica, Aurinete, Joyce, Renata, Simone, Cida, Camila, Flávia, Héliida e Filipe. Obrigada pelos ensinamentos e pela descontração. Vocês tornaram tudo isso mais fácil. Ao Claret e ao Vantuil, pelo auxílio imprescindível na condução dos experimentos e à Joyce e à Paula M., a quem devo a finalização deste trabalho.

Aos alunos e funcionários da UFLA, em especial a Thati, a Paula e a Ylana, por fazerem do doutorado os melhores anos da minha vida. Nunca me esquecerei do que vivemos. E as minhas eternas MAs: Ana Cristina, Ana Gorete, Maria e Mariana.

Ao pessoal do Laboratório de Anatomia Vegetal do DBI; a Leandro, Elíca e Marinês, pela paciência em me explicar todos os segredos da anatomia. Obrigada pelas risadas e, acima de tudo, pela amizade.

A toda a família IFS/Campus Glória, que soube entender, sempre me apoiou e torceu pela realização deste sonho, que é a conclusão desta etapa. Em especial aos meus alunos da turma de Agroecologia (“Ai que tudo!”), Jane Velma, Márcio, Mateus, Hélio, Alciene, Thaci, Carla, Erasto, André, Adriano, Thiago, Tiago, Emmanuelle e Cláudia.

Aos meus eternos “mestres”, professora Maria de Fátima Arrigoni-Blank e professor Arie Fitzgerald Blank, por abrirem os caminhos para que eu chegasse até aqui, pelos ensinamentos da época de graduação, pela torcida durante esta fase, pelo apoio na conclusão do doutorado e por aceitarem participar da banca avaliadora deste trabalho. A todos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal/UFS, em especial Andrea, Magna, Thaís, Fran e Aléa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, a minha eterna gratidão.

“O sertão é do tamanho do mundo”.

RESUMO

Objetivou-se diferenciar cultivares/espécies do gênero *Saccharum* quanto à anatomia foliar e do colmo, estabelecer um protocolo confiável para a realização da análise de citometria de fluxo, bem como comparar espécies e cultivares de cana-de-açúcar quanto ao conteúdo de DNA genômico. A anatomia foliar foi realizada em 17 cultivares e 2 espécies, nas quais foram feitas secções transversais e paradérmicas para cada indivíduo estudado. As variáveis analisadas foram espessura do limbo foliar, distância entre feixes vasculares, número de feixes vasculares, número de células buliformes, espessuras da cutícula, da epiderme abaxial e adaxial. Nas secções paradérmicas, nas faces adaxial e abaxial das folhas, foram mensurados a densidade estomática (número de estômatos.mm⁻²), o diâmetro polar dos estômatos, o diâmetro equatorial e a relação entre esses dois últimos. No colmo, as variáveis analisadas foram teor de lignina e celulose. Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo programa Sisvar[®] e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Para análise de cluster utilizou-se uma matriz de dados agrupados pela técnica de ligação de média de grupos (UPGMA) e, a partir desta análise, foi gerado um dendrograma. Os indivíduos puderam ser separados de acordo com as características da anatomia foliar. O dendrograma gerado a partir dos resultados das 18 variáveis avaliadas classificou os indivíduos em três grupos, considerando a distância euclidiana = 20. Para quantificar o conteúdo de DNA, foram analisadas 16 cultivares e 3 espécies pertencentes a este gênero. A determinação do protocolo confiável foi realizada na espécie *S. officinarum*, tendo sido avaliados a influência de tampões de extração, a presença, a ausência de RNase, as doses de iodeto de propídeo, os períodos de exposição ao iodeto de propídeo e os padrões de referência externos, nos quais foram determinados o coeficiente de variação e o conteúdo de DNA. Para análise estatística utilizaram-se os programas Sisvar[®] e o XLSTAT[®]. São recomendados o tampão de extração Marie e a utilização de no mínimo 15 µL de iodeto de propídeo. Não se deve realizar a leitura das amostras imediatamente após a adição deste. O uso de RNase é dispensável e, como padrão externo de referência, deve ser utilizado o tomateiro. Os indivíduos analisados podem ser separados em quatro grupos, pela análise das coordenadas principais, em função do conteúdo de DNA mensurado pelo protocolo confiável anteriormente determinado.

Palavras-chave: Histologia. Citômetro. Poaceae. Conteúdo de DNA.

ABSTRACT

The objective was to differentiate cultivars / species of the genus *Saccharum* regarding the leaf and stem anatomy, establish a reliable protocol for carrying out the flow cytometry analysis and compare species and cultivars of sugar cane as to their genomic DNA content. Leaf anatomy was conducted in 17 cultivars and 2 species, in which cross- and paradermic sections were made for each individual studied. The variables analyzed were leaf blade thickness, distance between vascular bundles, number of vascular bundles, number of bulliform cells and thickness of the abaxial and adaxial cuticles. The stomatal density (number of stomata.mm⁻²), the polar diameter of the stomata, their equatorial diameter and the ratio between these last two were measured in paradermic sections of the adaxial and abaxial leaf surfaces. In the stem, the variables analyzed were lignin and cellulose. Data were subjected to analysis of variance by the Sisvar[®] program and averages grouped by the Scott - Knott test at 5 % probability. For cluster analysis we used a matrix of data grouped by Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), and from this analysis, a dendrogram was generated. The individuals could be separated according to their leaf anatomy characteristics. The dendrogram generated from the results of the 18 evaluated variables classified individuals into three groups considering the Euclidean distance = 20. To quantify the DNA content, 16 cultivars and 3 species belonging to this genus were analyzed. The determination of reliable protocol was performed in the species *S. officinarum*, having evaluated the influence of extraction buffers, the presence and absence of Rnase, the propidium iodide doses, propidium iodide exposure periods and external reference standards, in which were determined the coefficient of variation and DNA content. For statistical analysis we used the programs Sisvar[®] and XLSTAT[®]. The Marie extraction buffer and the use of at least 15 µL of propidium iodide are recommended. One should not perform the reading of samples immediately after their addition. The use of RNase is dispensable, and as an external reference standard, the tomato should be used. Individuals analyzed can be separated into four groups through analysis of principal coordinates, in function of the DNA content measured by the previously determined reliable protocol.

Keywords: Histology. Cytometer. Poaceae. DNA content.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral.....	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Taxonomia e origem da cana-de-açúcar	14
2.2	Importância econômica da cana-de-açúcar no Brasil	15
2.3	Melhoramento genético da cana-de-açúcar	16
2.4	Histologia da cana-de-açúcar	18
2.5	Citometria de fluxo	25
	REFERÊNCIAS	28
	CAPÍTULO 2 Anatomia foliar e do colmo em cana-de-açúcar	37
1	INTRODUÇÃO	39
2	MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1	Material vegetal	41
2.2	Anatomia foliar e do colmo	41
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	CAPÍTULO 3 Confiabilidade das análises de citometria de fluxo e variação no conteúdo de DNA em cana-de-açúcar	66
1	INTRODUÇÃO	68
2	MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1	Material vegetal	70
2.2	Preparo e extração das amostras	70
2.2.1	Tampão de extração na confiabilidade das análises de citometria de fluxo	72
2.2.2	Utilização de RNase na confiabilidade das análises de citometria de fluxo	72
2.2.3	Quantidade de iodeto de propídeo na confiabilidade das análises de citometria de fluxo	72
2.2.4	Tempo de exposição dos núcleos ao iodeto de propídeo na confiabilidade das análises de citometria de fluxo	72
2.2.5	Padrão externo de referência na confiabilidade das análises de citometria de fluxo	73
2.2.6	Variação no conteúdo de DNA	73
2.3	Análises estatísticas	74
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e tem potencial para aumentar a produção. Este progresso, porém, é condicionado à obtenção de novas cultivares com bom desempenho produtivo, por meio do melhoramento genético (RODRIGUES et al., 2011).

A cana-de-açúcar é responsável por, aproximadamente, 60% da produção mundial de açúcar e etanol (ROCHA et al., 2007). É uma cultura de propagação preferencialmente assexuada, o melhoramento é feito em locais determinados e a seleção ocorre na geração F₁. A partir disso, pesquisadores buscam melhorar a eficiência das metodologias utilizadas no processo de seleção, o qual ocorre em âmbito de indivíduo.

A anatomia vegetal no gênero *Saccharum* é pouco explorada e, na maioria dos trabalhos, o objetivo é o de esclarecer problemas taxonômicos, ajudando, principalmente, a estabelecer a delimitação das espécies. Porém, esta área é útil também na caracterização, por consequência na diferenciação de cultivares inter e intraespecíficas e para auxiliar na seleção de indivíduos que têm características de interesse em programas de melhoramento genético. Isso porque estudos anatômicos são intimamente relacionados ao funcionamento do vegetal e à plasticidade das condições nas quais estes indivíduos estarão inseridos.

A citometria de fluxo é uma técnica que permite, por exemplo, a quantificação do conteúdo de DNA. Porém, um dos grandes problemas atuais da citometria é a necessidade de padronização dos resultados para que se evitem

erros de análise e se possibilite a comparação universal dos resultados. Quando se trabalha com número muito grande de indivíduos, como, por exemplo, em bancos de germoplasma, a determinação da quantidade de DNA nuclear por meio da citometria de fluxo pode substituir a contagem de cromossomos. O conhecimento do número de cromossomos, do nível de ploidia ou do conteúdo de DNA nuclear, além de essencial para a caracterização do germoplasma, é imprescindível para trabalhos de melhoramento genético na programação dos cruzamentos.

Além dessas, outras áreas são importantes para a caracterização intraespecífica e interespecífica de diversas espécies os parâmetros fitotécnicos, as técnicas em biologia molecular e a citogenética, por meio de características morfofisiológicas, dentre outras.

Diante do exposto, objetivou-se, com o presente trabalho, diferenciar cultivares/espécies do gênero *Saccharum* quanto à anatomia foliar e do colmo, estabelecer um protocolo confiável para a realização da análise de citometria de fluxo, bem como comparar espécies e cultivares de cana-de-açúcar quanto ao conteúdo de DNA genômico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia e origem da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*, família Poaceae e foi descrita taxonomicamente, pela primeira vez, por Linnaeus, em 1753, no livro “Species Plantarum” (HITCHCOCK, 1923).

A taxonomia e a nomenclatura do gênero têm sido um desafio (ALMARAJ; BALASUNDARAM, 2006). O gênero é conhecido por dois sinônimos, *Saccharophorum* e *Saccharifera*. Quando foi inicialmente descrito, o gênero consistia apenas de cinco a dez espécies originárias do Velho Mundo, inclusive *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. edule* e *S. barberi*. Depois, várias espécies foram alocadas em outros gêneros, incluindo *Andropogon*, *Anthoxanthum*, *Eriochrysis* e *Erianthus*, e foram transferidas para *Saccharum*. O caso de *Erianthus* é particularmente interessante. *Erianthus* é considerado intimamente relacionado com *Saccharum*, porém, vários botânicos o consideram pertencente a gêneros distintos, baseados, principalmente, em características florísticas. Porém, esta é muito variável e o gênero *Saccharum*, atualmente, compreende todas as espécies que foram descritas anteriormente como pertencentes ao gênero *Erianthus* (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Atualmente, a organização taxonômica mais utilizada (e aceita) é a proposta por Daniels e Roach (1987), que descrevem a cana-de-açúcar como membro da família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Andropogoneae, subtribo Saccharinae, grupo Saccharastrae e gênero *Saccharum*.

As atuais cultivares de cana-de-açúcar são híbridos originados de cruzamentos interespecíficos realizados no início do século XX, envolvendo,

principalmente, plantas de *S. officinarum* e *S. spontaneum* e retrocruzamento com *S. officinarum* (nobilização). Estes híbridos são citados como *Saccharum* spp. (LANDELL; BRESSIANI, 2010). Os mesmos têm de 100 a 130 cromossomos e cerca de 80% a 90% do genoma de *S. officinarum* e de 10% a 20% do genoma de *S. spontaneum* (PIPERIDIS; PIPERIDIS; HONT, 2010).

O centro de origem ainda é muito discutido, porém, alguns pesquisadores consideram que a cana-de-açúcar seja nativa do Arquipélago da Polinésia (CESNIK; MIOCQUE, 2004). Porém, provavelmente, o surgimento do gênero *Saccharum* é anterior à atual divisão dos continentes, o que torna difícil determinar a origem da mesma. O que se sabe é que há dois centros de diversidade, o Velho Mundo (Ásia e África) e o Novo Mundo (América do Norte, Central e do Sul) (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

2.2 Importância econômica da cana-de-açúcar no Brasil

A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância no agronegócio brasileiro, representando, a indústria sucroalcooleira, cerca de 2% das exportações nacionais, além de reunir 6% dos empregos agroindustriais brasileiros e contribuir de maneira efetiva para o crescimento do mercado interno de bens de consumo (BOLOGNA-CAMPBELL, 2007; UNICA, 2009). O Brasil encontra-se na posição de maior produtor mundial de cana-de-açúcar e exportador de açúcar (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2012).

A cana-de-açúcar é cultivada em área superior a 10 milhões de hectares e, para 2013, é estimada produção superior a 740 milhões de toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013), destinadas à fabricação de açúcar, álcool, aguardente e alimentação

animal, sendo a maioria das lavouras destinada à produção desses dois primeiros itens.

Em geral, 55% da cana brasileira são transformados em álcool e 45%, em açúcar. A cana é plantada no centro-sul e no norte-nordeste, possibilitando dois períodos de safra e, assim, há cana durante todo o ano. Em Minas Gerais, a atividade canavieira instalou-se no início do século XVIII, com a corrida do ouro, que representou o maior movimento migratório do Brasil Colônia, estimulando a implantação de atividades agrícolas na capitania para suprir as necessidades da população envolvida com a extração do ouro (CAMPELO, 2002).

Com a crescente demanda, atualmente, por recursos energéticos substitutos do petróleo, a cultura canavieira está em plena expansão no Brasil, rumo a regiões de marcantes déficits hídricos em algumas épocas do ano, como Goiás, Triângulo Mineiro, Mato Grosso do Sul e oeste do estado de São Paulo (GUIMARÃES, 2011).

A importância da cana-de-açúcar está em sua múltipla utilização, tanto “in natura”, por meio da forragem para alimentação animal, ou como base para a fabricação de aguardente, rapadura, melado, açúcar e álcool (RIBEIRO, 1997).

A relevância da cana-de-açúcar no agronegócio brasileiro é indiscutível e, apesar de o país destacar-se no cenário internacional por toda a tecnologia já empregada nas diferentes etapas de produção, a pesquisa científica ainda tem muito a contribuir para a maximização do processo produtivo, desde a lavoura até a indústria (COSTA et al., 2007).

2.3 Melhoramento genético da cana-de-açúcar

Os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar conduzidos em dezenas de países têm sido responsáveis por mudanças essenciais no perfil

da planta de cana-de-açúcar, utilizando, para este fim, estratégias de hibridação e seleção diferenciadas (LANDELL et al., 2005). O objetivo principal dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar é prover novas cultivares que ampliem a produtividade de energia (açúcar, álcool e fibra).

No Brasil, os programas de melhoramento já lançaram um grande número de cultivares de cana-de-açúcar. Essa diversidade possibilita uma restrição natural quanto à área plantada por uma única cultivar.

É importante que cada programa de melhoramento mantenha o seu próprio germoplasma composto por híbridos comerciais, pré-comerciais e espécies parentais. Para ser utilizado no processo de hibridização (LANDELL; BRESSIANI, 2010), é essencial que este germoplasma seja bem caracterizado, para facilitar a busca de genes específicos pelo melhorista.

Dentre as ferramentas existentes para este fim, a citometria de fluxo tem destaque, uma vez que, quando padronizada, permite a caracterização de milhares de indivíduos em um curto espaço de tempo, de acordo com o conteúdo de DNA, quando comparada a técnicas citogenéticas (OLIVEIRA, 2011).

Características cariotípicas (número, forma e tamanho dos cromossomos), padrão de bandas do DNA no cromossomo, número e localização de sítios específicos de DNA nos cromossomos, além do comportamento dos cromossomos durante os processos meióticos e mitóticos são alguns dos aspectos estudados pela citogenética, que contribui com um conjunto de informações relevantes para o entendimento da planta em si e de seu processo de melhoramento genético. Além desses aspectos gerais, estudos que envolvam frequência de recombinação entre genomas homólogos e homeólogos, detecções de anomalias cromossômicas e análises de fertilidade são também amplamente aplicados nessa área (SINGH, 1993).

Por outro lado, a anatomia tem sido utilizada, há muito tempo, como importante ferramenta para auxiliar estudos taxonômicos. As avaliações

anatômicas são de especial interesse, principalmente quando se deseja realizar estudo comparativo com acessos que apresentam diferentes níveis de ploidia. Isto se deve ao fato de que o aumento do conteúdo de DNA nuclear afeta algumas características fenotípicas, apresentando alterações que podem ser avaliadas mediante a observação da anatomia da planta (MADAIL, 2011).

Não existem trabalhos de melhoramento visando à obtenção, por exemplo, de cultivares de cana destinadas exclusivamente à produção de cachaça. O que se faz é uma seleção, dentre as cultivares disponíveis para a produção de açúcar e álcool, tentando-se obter aquelas que podem ser utilizadas na produção de cachaça artesanal, pois, geralmente, uma cultivar que é boa para açúcar e álcool, também é boa para a produção de cachaça. Porém, algumas características, como maior rendimento de colmos por hectare, alto teor de sacarose, teor de fibra médio (11% a 12%), fácil despalha, resistência ao tombamento, boa adaptação a diferentes tipos de solo e clima, ausência de florescimento, baixa isoporização e período de utilização industrial longo, são objetivos no melhoramento de cana-de-açúcar para a fabricação de aguardente (MACÊDO et al., 2009).

Em Minas Gerais, ainda são cultivadas, para a produção de cachaça, cultivares antigas. Contudo, já existem alguns trabalhos recomendando novas cultivares para este fim. Com esse objetivo, Anjos et al. (2007) apontaram a ‘SP 791011’ como uma cultivar que apresenta bons rendimentos teóricos de aguardente em litros por hectare da cana-planta e da cana-soca. Porém, deve-se ressaltar que essa cultivar é suscetível à ferrugem, em algumas regiões, a ponto de não estar sendo indicada para o cultivo na região sul do estado de Minas Gerais (ANDRADE; CARDOSO, 2010).

2.4 Histologia da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, sendo uma planta que possui o metabolismo do tipo C_4 , com ciclo de vida longo considerada semiperene, apresenta maior eficiência no uso da água, nutrientes, CO_2 e energia luminosa, produzindo uma quantidade considerável de biomassa e há ocorrência da anatomia Kranz em suas folhas. As plantas C_4 , tais como a cana-de-açúcar, desenvolveram uma via alternativa na qual o primeiro produto da fotossíntese é um composto com quatro carbonos. Células da bainha do feixe vascular e do mesófilo são dispostas em coroas concêntricas em torno dos feixes para formar anatomia Kranz (HABERLANDT, 1896). O metabolismo C_4 nas folhas com este tipo de anatomia é a via fotossintética mais produtiva (WANG et al., 2013). Existem, ainda, três variações desse metabolismo, de acordo com o mecanismo de transporte de compostos de quatro átomos de carbono, sendo que em cana-de-açúcar admite-se que este seja dependente da nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADP:ME). Contudo, em estudos recentes propõe-se a ocorrência de mais de um tipo de transporte dos C_4 na cana-de-açúcar, especialmente em folhas maduras, nas quais há abundância de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK), uma segunda variação do mecanismo de transporte desse metabolismo (CALSA JUNIOR; FIGUEIRA, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2013).

No tocante à anatomia foliar, apresenta, ainda, cutícula na epiderme em ambas as faces, tecido este que apresenta células com paredes delgadas e é uniestratificado (AHMAD et al., 2010; CARR; KNOX, 2011).

Em Poaceae, os estômatos estão dispostos em fileiras e restritos à zona intercostal, sendo separados por células interestomáticas (METCALFE, 1960) e classificados como paracíticos, pois têm duas células subsidiárias (células anexas) com seu maior eixo perpendicular ao maior eixo das células estomáticas (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009), sendo nivelados em relação às demais células epidérmicas.

Por apresentar estômatos tanto na epiderme na face abaxial como na adaxial, porém, em maior densidade na face abaxial, a cana-de-açúcar é considerada uma espécie anfi-hipostomática (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

A cutícula desempenha papel importante para minimizar a perda de água e o aumento da resistência das plantas às alterações bióticas por meio da sinalização de possíveis estresses e também mudanças abióticas, por aumentar a sobrevivência de plantas em condições ambientais adversas. Descobertas recentes sugerem que a cutícula esteja associada também à biossíntese e à sinalização, por meio da sinalização de estresses bióticos e abióticos, do fitormônio ácido abscísico (ABA) (WANG et al., 2011), o qual regula muitos aspectos do crescimento e do desenvolvimento das plantas, bem como as respostas ao ambiente, tais como o fechamento dos estômatos em condições de estresse hídrico, controlando, assim, a transpiração e as trocas gasosas (NAMBARA; MARION-POLL, 2005).

As células buliformes são células grandes altamente vacuolizadas, presentes em monocotiledôneas (exceto na ordem Helobiae). São também conhecidas como “células motoras”, pois, em condições de seca, perdem pressão de turgor, diminuindo seu tamanho, o que ocasiona o enrolamento das folhas. Quando os níveis de água se tornam suficientes para as plantas, estas células se expandem e as folhas abrem-se novamente (ALVAREZ; ROCHA; MACHADO, 2008; ITOH et al., 2005). No entanto, os mecanismos genéticos e moleculares relacionados ao enrolamento das folhas e a função das células buliformes nesse processo continuam a ser elucidados, a fim de entender como se dá este processo (XIANG et al., 2012).

Em *Saccharum* spp. estas células estão presentes em formato de leque, com tamanhos diferentes e somente na face adaxial da epiderme. Os feixes vasculares são rodeados por uma única bainha vascular parenquimática. O

mesofilo é indiferenciado em parênquima paliçádico e esponjoso e é constituído por células do parênquima clorofiliano ao redor dos feixes vasculares (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009; CHAVES, 2012). Ligados à bainha do feixe encontram-se cordões de esclerênquima em contato com uma ou com ambas as faces da epiderme, como os mencionados por Gould (1968). Mauseth (1988) designou esses cordões de esclerênquima de extensão de bainha do feixe vascular, que tem a função mecânica de auxiliar no desenrolar da folha, depois de estabelecidos níveis de água satisfatórios, permitindo a manutenção da forma da folha.

Ferreira et al. (2007), trabalhando com as características anatômicas das folhas de cinco cultivares de cana-de-açúcar (RB867515, RB957689, RB855113, SP80-1842 e SP80-1816) submetidas à análise multivariada, verificaram a presença de três principais tecidos/células na lâmina foliar de *Saccharum* spp.: mesofilo, células buliformes e células da bainha do feixe vascular. As análises da densidade e do tamanho dos estômatos também apresentaram dados estatisticamente significativos. Tais resultados são importantes na escolha de cultivares a partir de seu grau de suscetibilidade a herbicidas, tendo em vista que essas variáveis são altamente correlacionadas com esta característica.

Bison et al. (2012) realizaram a caracterização anatômica da lâmina foliar de quatro cultivares de cana-de-açúcar (IACSP94-2094, IACSP94-2101, IACSP95-5000 e SP79-1011) e concluíram que os materiais analisados são classificados como anfiestomática (os estômatos estão presentes em ambas as faces das folhas). Todos os genótipos apresentam epiderme uniestratificada e lignificada em ambas as faces, com células menores na face abaxial em relação à adaxial e células buliformes na face adaxial. Estes resultados complementam estudos fisiológicos que têm por objetivo fornecer subsídios para o

desenvolvimento de programas de melhoramento do setor sucroalcooleiro brasileiro.

Trabalhos desse tipo, em cultivares de cana-de-açúcar, são escassos na literatura. O enfoque está nas espécies deste gênero, em especial *S. officinarum* e *S. spontaneum*, como apresentaram Ahmad et al. (2010), Artschwager (1940), Julien, Irvine e Benda (1989), Metcalfe (1960) e Venkatraman (1922). Chaves (2012) realizou trabalhos histológicos na lâmina foliar e em raízes de espécies nativas do Brasil do referido gênero.

Os colmos de cana-de-açúcar são caracterizados por nós bem marcados e entrenós distintos, quase sempre fistulosos e espessos, apresentando, assim, alto teor de fibras. Estruturalmente, o colmo da cana é formado por vários tipos de tecidos, tais como o córtex, a epiderme, o tecido parenquimatoso e as hastes fibrovasculares. O córtex é composto de fibras muito lignificadas, sendo caracterizado pela espessura da parede celular, o comprimento e a rigidez de suas fibras. Este tecido confere proteção contra os efeitos mecânicos externos, servindo de suporte para a planta. Os feixes fibrovasculares, compostos de fibras curtas e vasos que atuam na sustentação e na condução das seivas ao longo da planta, também estão presentes (PATURAU, 1989). O tecido parenquimático não é diferenciado em córtex e medula, no entanto, as células da periferia do colmo são menores, angulares e bastante espessas. Já as células localizadas na parte central são maiores e com paredes sinuosas. Existem grandes e irregulares cavidades formadas pela desintegração das células do parênquima células (KUMAR et al., 2009), como pode ser observado na Figura 1.

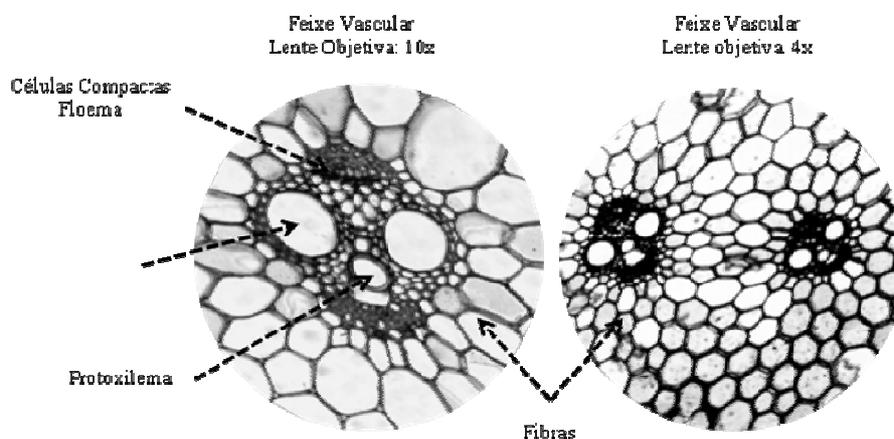


Figura 1 Corte transversal do colmo de cana (*Saccharum* spp.). UFLA, Lavras, MG, 2013

As fibras tornam os colmos eretos, evitando o tombamento e, na indústria, a importância está na moagem e no balanço térmico da fábrica. São a parte sólida da planta, formada por celulose, ligninas, hemicelulose, pentosanas, pectinas e outros componentes, sendo a maior parte delas (90%) formada pelos três primeiros compostos (PIRES et al., 2006).

O teor de fibra da cana é uma característica varietal, mas é também influenciado por diversos fatores, como clima (chuva e temperatura), solo (umidade e fertilidade), teor de celulose e ligninas, época de corte e método de determinação (FERNANDES, 2000). A interação entre celulose, hemicelulose e lignina determina a ultraestrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos (RABELO, 2010).

Para Marques, Marques e Tasso Junior (2001), na fase de extração, o aumento no teor de fibra de cana resulta na dificuldade da moenda em extrair a sacarose. Isso acontece, pois a fração do caldo, uma vez extraída, em parte é reabsorvida pela fibra da cana. A quantidade reabsorvida varia de forma proporcional ao teor de fibra na matéria-prima. Porém, a diminuição no teor de

fibra pode causar o acamamento das plantas de cana-de-açúcar e prejudicar o balanço energético da indústria.

O polímero apresenta resistência à tração e algumas regiões apresentam flexibilidade. Apesar da sua simplicidade química, existe uma complexa gama de formas físicas da celulose, devido, principalmente, à diversidade de origem e aos processamentos tecnológicos subsequentes a que a biomassa celulósica é sujeita (BEGUIN; AUBERT, 1994).

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentram-se, principalmente, na camada primária e na secundária, nas quais estão intimamente associadas à celulose e à lignina. As hemiceluloses diferem da celulose, principalmente por sua constituição em diferentes unidades de açúcares, formando cadeias moleculares curtas e bastante ramificadas, não havendo na literatura teste histoquímico específico para este composto (RABELO, 2010).

Depois da celulose, a lignina é a substância orgânica polimérica mais abundante nas plantas. Ela está presente, principalmente, na lamela média e na parede secundária, sendo a substância que confere rigidez à parede das células (BRISTOW; KOLSETH, 1986).

Corroborando as informações supracitadas, Kumar et al. (2009), analisando colmo de *S. sinensis*, constatou, que o mesmo é composto por epiderme uniestratificada, tecido base não diferenciado correspondente ao parênquima e vários feixes vasculares dispersos.

Resultados significativos foram encontrados na análise dos teores de lignina e celulose, na espessura da epiderme presente em colmos de cultivares de capim-elefante (Poaceae) e em sua interferência na digestibilidade animal. Os autores salientaram também a importância de avaliações relacionadas ao tamanho dos feixes vasculares para melhor qualidade das inferências, tornando,

por meio destas análises, possível a seleção de cultivares superiores para a melhoria de variáveis histológicas (FERREIRA et al., 2010).

2.5 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo consiste em analisar partículas microscópicas em suspensão, obrigadas a interceptar, dentro de um fluxo de fluido, um foco de luz intensa (SHAPIRO, 2004) e, quando uma partícula absorve a luz, os elétrons são levados do estado fundamental para um estágio excitado. Certas moléculas, que perdem energia por fluorescência emitindo luz (fluorescência), quando excitadas, são separadas pela utilização de uma série de espelhos dicróicos, filtros e fotomultiplicadores (EECKHAUT; LEUS; HUYLENBROECK, 2005). Assim, é possível separá-las da fluorescência emitida por diferentes moléculas excitadas pela mesma fonte de luz, utilizando espelhos dicróicos (KACHEL; MESSESCHMIDT; HUMMEL, 1990).

Os circuitos dentro do aparelho convertem esses sinais fluorescentes em valores digitais que são armazenados e exibidos na forma de histogramas (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007; OCHATT, 2011). Os sinais de cada partícula vão se acumulando, em tempo real, nestes histogramas mono ou biparamétricos visualizados no monitor de um computador (CÔRTE-REAL et al., 2002).

Assim, um citômetro de fluxo compõe-se de fluidos, óptica e eletrônica, ajustados para permitir a medição de células em suspensão que fluem juntas através de um volume precisamente iluminado (ROBINSON, 2006).

O material vegetal tem várias características únicas não encontradas em animais, o que é um desafio para a análise por citometria. Primeiro, as células vegetais têm paredes rígidas e são mantidas juntas por uma matriz extracelular para formar complexos tecidos tridimensionais. Não é uma tarefa fácil produzir

uma suspensão líquida de células individuais com formato regular e partículas subcelulares, tais como núcleos, mitocôndrias, cloroplastos e cromossomos. Outros problemas ocorrem devido à composição química do citosol. As células vegetais produzem uma vasta variedade de metabólitos secundários que podem interferir em um determinado ensaio, como, por exemplo, podem alterar a coloração do DNA nuclear (LOUREIRO et al., 2006).

Nesse contexto, a disseminação do uso da citometria de fluxo com os tecidos da planta se deve, principalmente, à genialidade de Galbraith et al. (1983), cuja metodologia inovadora consiste no isolamento de núcleos a partir de protoplastos. Com a utilização de uma lâmina de barbear para a homogeneização do tecido, os autores revolucionaram a citometria em plantas, simplificando o isolamento de núcleos de células a partir de praticamente qualquer tipo de órgão ou tecido de planta. A quantidade de DNA é expressa em picogramas (pg), 10^{-12} gramas ou em megapares de bases de nucleotídeos (Mb = 10^6 pares de bases), sendo que 1 pg corresponde a 980 Mpb (BENNETT; LEITCH, 1995).

Johnston et al. (1999) definiram a citometria de fluxo como uma técnica eficiente e confiável para a caracterização do conteúdo de DNA de plantas.

Segundo Shapiro (2004), na citometria de fluxo, as partículas são analisadas individualmente e em alta velocidade, e, assim, grandes populações podem ter o conteúdo de DNA mensurado em um curto espaço de tempo. Diante disso, Edmé et al. (2005), analisando o tamanho do genoma de três híbridos interespecíficos F1 obtidos a partir dos cruzamentos entre *S. officinarum* cv. Verde alemão x *S. spontaneum* cv. IND 81-146, *S. spontaneum* cv. Pin 84-1 x *S. officinarum* cv. Muntok Java, encontraram o conteúdo de DNA de 3,05 pg, para IND 81-146; 8,91 pg, para Muntok Java e o conteúdo de DNA das progênes estava dentro da gama de valores de DNA dos respectivos pais.

Estes mesmos autores afirmaram que o tamanho do genoma é relativamente estável dentro de espécies *S. officinarum* e dentro das cultivares de cana comerciais analisadas nesse estudo (6,30-7,05 pg).

Zhang et al. (2012), analisando o tamanho do genoma de 16 acessos de *Saccharum officinarum*, observaram que o conteúdo de DNA dos mesmos variaram entre 7,83-8,27 pg. Esses autores afirmaram também que a citometria de fluxo é uma abordagem alternativa tanto para verificar informações cromossômicas, se disponíveis, como estimar o nível de ploidia, se esta informação não for conhecida, pois o tamanho do genoma é altamente correlacionado com o número de cromossomos, indicando que este valor pode ser calculado a partir da estimativa do tamanho genômico (PALOMINO et al., 2012).

Pouco se sabe sobre a variação do tamanho do genoma dentro e entre as espécies do gênero *Saccharum* e estas informações podem ajudar na utilização dos recursos genéticos de cana para programa de reprodução de duas maneiras: (1) validar o nível de ploidia de acessos com números de cromossomos conhecidos e (2) prever o nível de ploidia para aqueles que ainda não possuem número de cromossomos definido (SOUZA et al., 2011). Contudo, esta técnica não foi largamente explorada em cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F. et al. Taxonomic utilization of anatomical characters in tribe Andropogoneae (Poaceae) based on transverse sections of leaves. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 4, n. 14, p. 1349-1358, July 2010.
- ALMARAJ, V. A.; BALASUNDARAM, N. On the taxonomy of the members of 'Saccharum complex'. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 53, n. 1, p. 35-41, Feb. 2006.
- ALVAREZ, J. M.; ROCHA, J. F.; MACHADO, S. R. Bulliform cells in *Loudetiopsischrysothrix* (Nees) Conert and *Tristachya leiostachya* Nees (Poaceae): structure in relation to function. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 1, p. 113-119, Jan./Feb. 2008.
- ANDRADE, L. A. de B.; CARDOSO, M. das G. Cana-de-açúcar para produção de cachaça. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2010. p. 747-763.
- ANJOS, I. A. dos et al. Efeitos da adubação orgânica e da época de colheita na qualidade da matéria-prima e nos rendimentos agrícola e de açúcar mascavo artesanal de duas variedades de cana-de-açúcar (cana-planta). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 59-63, jan./fev. 2007.
- ARTSCHWAGER, E. Morphology of the vegetative organs of sugarcane. **Journal of agricultural Research**, Lahore, v. 60, n. 8, p. 503-549, 1940.
- BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 25-58, Jan. 1994.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, London, v. 76, n. 2, p. 113-176, June 1995.

BISON, J. V. S. et al. Caracterização anatômica da lâmina foliar de quatro genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. - Poaceae). In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO DE BOTÂNICA, 19., 2012, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto de Botânica, 2012. 1 CD-ROM.

BOLOGNA-CAMPBELL, I. **Balço de nitrogênio e enxofre no sistema solo cana-de-açúcar no ciclo de cana-planta**. 2007. 112 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2007.

BRISTOW, J. A.; KOLSETH, P. **Paper, structure and properties**. New York: M. Dekker, 1986. 390 p.

CALSA JUNIOR, T.; FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C4 metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 63, n. 6, p. 745-762, Jan. 2007.

CAMPELO, E. A. P. Agronegócio da cachaça de alambique de Minas Gerais: panorama econômico e social. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 7-18, 2002.

CARR, M. K.; KNOX, J. W. The water relations and irrigation requirements of sugar cane (*Saccharum officinarum*): a review. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 47, n. 1, p. 1-25, Jan. 2011.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2004. 307 p.

CHAVES, B. D. **Aspectos anatômicos da raiz e lâmina foliar de *Saccharum L. (Poaceae)* nativas do Brasil**. 2012. 260 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, n. 1, p. 62-89, Mar. 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, agosto/2012**. Brasília, 2012. 18 p.

CÔRTE-REAL, M. et al. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, Porto, v. 71, n. 1, p. 19-33, 2002.

COSTA, M. C. G. et al. Distribuição radicular, estado nutricional e produção de colmos e de açúcar em soqueiras de dois cultivares de cana-de-açúcar em solos distintos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 31, n. 6, p. 1503-1514, nov./dez. 2007.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 7-84.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: _____. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. p. 41-65.

EDMÉ, S. J. et al. Determination of DNA content and genome size in sugarcane. **Journal American Society Sugarcane Technologists**, Baton Rouge, v. 25, p. 1-16, Jan. 2005.

EECKHAUT, T.; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J. V. Exploitation of flow cytometry for plant breeding. **Acta Physiologiae Plantarum**, Pozann, v. 27, n. 4B, p. 743-750, 2005.

FERNANDES, A. C. **Cálculos na agroindústria da cana de açúcar**. Piracicaba: STAB, 2000. 193 p.

FERREIRA, E. A. et al. Leaf blade quantitative anatomy of sugarcane cultivars and clones. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 25, n. 1, p. 25-34, 2007.

FERREIRA, G. D. G. et al. Histologia do colmo de clones de capim-elefante na região do agreste de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 11, n. 1, p. 36-47, jan./mar. 2010.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, New York, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GOULD, F. W. **Grass systematics**. New York: McGraw Hill Book, 1968. 382 p.

GUIMARÃES, A. C. R. **Caracterização de variedades de cana-de-açúcar (*Sacchaum spp.*) submetidas a déficit hídrico**. 2011. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2011.

HABERLANDT, G. **Physiologische pflanzenanatomie**. Leipzig: W. Engelman, 1896. 616 p.

HITCHCOCK, A. S. Type species of the first 100 genera of Linnaeus "Species Plantarum". **Botanical Society of America**, Saint Louis, v. 1, p. 510-517, Jan. 1923.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.IBGE.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl1.asp?c=1613&n=0&u=0&z=p&o=23&i=P>>. Acesso em: 23 maio 2013.

ITOH, J. et al. Rice plant development: from zygote to spikelet. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 23-47, Jan. 2005.

JOHNSTON, J. S. et al. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 86, n. 5, p. 609-613, May 1999.

JULIEN, M. H. R.; IRVINE, J. E.; BRENDA, G. T. A. Anatomía, morfología y fisiología de la caña de azúcar. In: RICAUD, C. et al. (Ed.). **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 18-20.

KACHEL, V.; MESSESCHMIDT, R.; HUMMEL, P. Eight-Parameter PC-AT based flow cytometric data system. **Cytometry Part A**, New York, v. 11, n. 7, p. 805-812, Mar. 1990.

KUMAR, C. A. S. et al. Pharmacognostical and preliminary phytochemical investigations on the stem of *Saccharum spontaneum*. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Nsukka, v. 1, n. 3, p. 129-136, May 2009.

LANDELL, M. G. A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2010. p. 101-156.

LANDELL, M. G. A. et al. Seleção de novas variedades de cana-de-açúcar e seu manejo e produção. **Informações Agrônômicas**, Piracicaba, n. 110, p. 18-24, 2005.

LOUREIRO, J. C. M. et al. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 3, p. 515-527, Sept. 2006.

MACÊDO, G. A. R. et al. Variedades de cana-de-açúcar para a produção de cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 20-24, jan./fev. 2009.

MADAIL, R. H. **Descritores morfológicos e conteúdo de DNA na caracterização de acessos de bananeira**. 2011. 105 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

MARQUES, M. O.; MARQUES, T. A.; TASSO JUNIOR, L. C. **Tecnologia do açúcar: produção e industrialização da cana de açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 2001. 166 p.

MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. Davis: B. Cummings, 1988. 576 p.

METCALFE, C. R. **Anatomy of the monocotyledons: I Gramineae**. New York: Clarendon, 1960. 731 p.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 165-185, June 2005.

OCHATT, S. J. Flow cytometry in plant breeding. **Cytometry Part A**, New York, v. 73A, n. 7, p. 581-598, July 2008.

OLIVEIRA, A. C. L. **Citometria de fluxo e redes neurais artificiais em variedades de bananeira, figueira, macieira e pessegueiro**. 2011. 125 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

PALOMINO, G. et al. Nuclear genome size and cytotype analysis in *Agave cupreata* Trel. & Berger (Agavaceae). **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, New York, v. 65, n. 4, p. 281-294, Dec. 2012.

PATURAU, J. M. **By-products of the cane sugar industry**: an introduction to their industrial utilization. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 1989. 435 p.

PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; HONT, A. d'. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 284, n. 1, p. 65-67, 2010.

PIRES, A. J. V. R. R. A. et al. Bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 3, p. 953-957, 2006.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RIBEIRO, J. C. G. M. **Fabricação artesanal da cachaça mineira**. Belo Horizonte: Perform, 1997. 162 p.

ROBINSON, J. P. **Introduction to flow cytometry**: flow cytometry talks. Purdue: Purdue University Cytometry Laboratory, 2006. Disponível em: <<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.html>>. Acesso em: 26 jun. 2013.

ROCHA, F. R. et al. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, London, v. 8, p. 71-93, Mar. 2007.

RODRIGUES, L. R. et al. Ensaios preliminares para a clonagem in vitro de acessos de cana-de-açúcar cultivados no estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 17, n. 1/4, p. 1-6, jan./mar. 2011.

SHAPIRO, H. M. The evolution of cytometers. **Cytometry Part A**, New York, v. 58A, n. 1, p. 13-20, 2004.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC, 1993. 391 p.

SOUZA, G. M. et al. The sugarcane genome challenge: strategies for sequencing a highly complex genome. **Tropical Plant Biology**, Berkeley, v. 4, p. 145-156, June 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

ÚNICA. **Dados de produção de cana 2008**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em: 28 jun. 2009.

VENKATRAMAN, R. S. T. S. Sugarcane root systems: studies in development an anatomy. In: INDIAN SCIENCE CONGRESS, 9., 1922, Madras. **Proceedings...** Madras: ISC, 1922. p. 381-395.

WANG, P. et al. Genome-wide transcript analysis of early maize leaf development reveals gene cohorts associated with the differentiation of C4 Kranz anatomy. **The Plant Journal**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 656-670, Aug. 2013.

WANG, Z. et al. The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 5, p. 1971-1984, May 2011.

XIANG, J. et al. Semi-rolled LEAF1 encodes a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored protein and modulates rice leaf rolling by regulating the formation of bulliform cells. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 159, n. 4, p. 1488-1500, Aug. 2012.

ZHANG, J. et al. Genome size variation in three *Saccharum* species. **Euphytica**, Wageningen, v. 185, n. 3, p. 511-519, Mar. 2012.

CAPÍTULO 2

Anatomia foliar e do colmo em cana-de-açúcar

RESUMO

As características anatômicas de uma planta podem auxiliar na diferenciação interespecífica e intraespecífica. Estudos desse tipo em cana-de-açúcar ainda são raros. Com isso, este trabalho foi realizado objetivando diferenciar cultivares/espécies do gênero *Saccharum* quanto à anatomia foliar e do colmo. Foram analisadas 17 cultivares e 2 espécies de cana-de-açúcar. Foram avaliadas 15 secções transversais e 40 paradérmicas (20/face) para cada indivíduo estudado. As variáveis analisadas nas secções transversais foram espessura do limbo foliar, distância entre feixes vasculares, número de feixes vasculares, número de células buliformes, espessuras da cutícula e epiderme nas faces abaxial e adaxial. Nas secções paradérmicas, nas faces adaxial e abaxial das folhas, foram obtidos a densidade estomática (número de estômatos.mm⁻²), o diâmetro polar dos estômatos, o diâmetro equatorial e a relação entre diâmetro polar: diâmetro equatorial). Para análise do colmo foram retiradas seções centrais da região do entrenó, sendo avaliadas 15 secções centrais dos colmos de cada cultivar e espécie. As variáveis analisadas foram teor de lignina e celulose. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa Sisvar[®] e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Para análise de cluster, utilizou-se uma matriz de dados agrupados pela técnica de ligação de média de grupos (UPGMA) e, a partir desta análise, foi gerado um dendrograma. Os indivíduos podem ser separados de acordo com as características da anatomia foliar. Plantas com feixes vasculares mais próximos têm maior número destes e isso confere maior resistência a condições xerófitas e maior translocação de fotoassimilados. As células da epiderme são lignificadas e, na face adaxial, apresentam células motoras do tipo buliformes. A quantidade de lignina e celulose variou entre as espécies e as cultivares, tendo a cultivar CTC 7 apresentado os menores níveis de ambos. O dendrograma gerado a partir dos resultados das 18 variáveis anatômicas classificou os indivíduos em três grupos, considerando a distância euclidiana média = 20.

Palavras-chave: *Saccharum* spp. Histologia. Dendrograma.

ABSTRACT

The anatomical characteristics of a plant can help in the interspecific and intraspecific differentiation. Studies of this type in cane sugar are still rare. Therefore, this investigation was carried out to differentiate cultivars / species of the genus *Saccharum* regarding the leaf and stem anatomy. We analyzed 17 cultivars and two species of cane sugar. We evaluated 15 cross sections and 40 paradermic sections (20/surface) for each individual studied. The variables analyzed in cross sections were leaf thickness, distance between vascular bundles, number of vascular bundles, bulliform cell count and thickness of the abaxial and adaxial cuticles. The stomatal density (number of stomata.mm⁻²), the polar diameter of the stomata, their equatorial diameter and the ratio between these last two were measured in paradermic sections of the adaxial and abaxial leaf surfaces. For stem analysis, central sections were taken from the internode region, evaluating 15 central sections of the stems of each cultivar and species. The variables analyzed were lignin and cellulose. Data were subjected to analysis of variance by the Sisvar[®] program and averages grouped by Scott - Knott test at 5 % probability. For cluster analysis, we used a matrix of data grouped by the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), and from this analysis, a dendrogram was generated. Individuals can be separated according to the leaf anatomy characteristics. Plants with closer vascular bundles have a higher number of them and this provides greater resistance to xerophytic conditions and increased translocation of photoassimilate. The epidermal cells are lignified and have bulliform type motor cells on the adaxial surface. The amount of lignin and cellulose varied among species and cultivars, the cultivar CTC 7 presenting the lowest levels of both. The dendrogram generated from the results of 18 anatomical variables classified the subjects into three groups, considering the mean Euclidean distance = 20.

Keywords: *Saccharum* spp. Histology. Dendrogram.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das mais importantes espécies cultivadas no mundo. No Brasil, em 2013, estima-se que serão produzidas mais de 743 milhões de toneladas, o que representa um aumento de 3,94% em relação à safra anterior, sendo o estado de Minas Gerais responsável pela produção de mais de 740 milhões de toneladas, ficando atrás apenas do estado de São Paulo (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013). Essa produção destina-se ao setor sucroalcooleiro, à fabricação de cachaça, à alimentação animal e à obtenção de sementes, dentre outros destinos. Diante dessa produção, é notável a importância socioeconômica desta espécie para a economia nacional.

Mesmo com a relativa informalidade do agronegócio da cachaça, a produção mineira tem destaque nacional, sendo Minas Gerais o primeiro estado em volume de produção, com cerca de 200 milhões de litros/ano, que equivalem a 50% da produção nacional. Isto destaca a relativa importância deste segmento da agricultura para a economia do estado. A obtenção de novas cultivares por meio de programas de melhoramento genético pode, por exemplo, gerar maior lucratividade sem aumento das despesas no agronegócio da cachaça (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE, 2001).

A anatomia vegetal tem importante destaque na contribuição com diversas áreas do conhecimento, como botânica, fisiologia e ecologia. Os primeiros estudos da anatomia de plantas tinham por objetivo entender a distribuição e a organização dos principais tecidos no corpo do vegetal. Além disso, a combinação de caracteres na planta pode ser necessária para distinguir acuradamente acessos dentro das coleções de germoplasma (STEINER; SANTOS, 2001).

A cana-de-açúcar é uma planta que tem o metabolismo do tipo C4 e, devido a isso, há ocorrência da anatomia Kranz em suas folhas. A cutícula está presente na epiderme localizada em ambas as faces, possui paredes delgadas e este tecido é uniestratificado. Células buliformes estão presentes em formato de leque, com tamanhos diferentes e somente na face adaxial da folha os feixes vasculares são rodeados por uma única bainha vascular parenquimática; o mesofilo é indiferenciado em parênquima paliçádico e esponjoso e é constituído por células incolores e parênquima clorofiliano ao redor dos feixes vasculares (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009; CHAVES, 2012). O colmo é preenchido por tecido parenquimático, não diferenciado em córtex e medula (KUMAR et al., 2009).

Metcalf (1960) estudou a anatomia da família Poaceae (Gramineae) e determinou características anatômicas, tais como tipo de célula epidérmica, tipo de estomato e a disposição das células esclerificadas em torno dos feixes vasculares. Em relação à anatomia de *Saccharum*, os trabalhos têm focado, principalmente, cultivares de *S. officinarum* e *S. spontaneum*, como mostram os trabalhos de Ahmad et al. (2010), Artschwager (1940), Bison et al. (2012), Ferreira et al. (2007), Julien, Irvine e Benda (1989), Metcalfe (1960) e Venkatraman (1922). No entanto, há poucas informações, na literatura, a respeito da anatomia foliar comparativa das espécies e cultivares, estando a caracterização deste gênero apenas em estudos florísticos, podendo ser complementada por trabalhos com anatomia vegetal (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Com isso, este trabalho foi realizado com o objetivo de diferenciar cultivares/espécies do gênero *Saccharum* quanto à anatomia foliar e do colmo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

A caracterização da anatomia foliar e do colmo foi realizada em 17 cultivares e 2 espécies de cana-de-açúcar (SP 842025, SP 801842, SP 891115, SP 813250, RB 925211, RB 855453, RB 867515, CTC 159, RB 925345, CTC 9, CTC 16, CTC 14, CTC 7, CTC 8, CTC 1, CTC 2, CO 413, *Saccharum officinarum* L. e *S. sinensis* L.) mantidas pelo Departamento de Agricultura e localizadas no painel de cultivares de cana-de-açúcar da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os indivíduos avaliados tinham 12 meses de cultivo, cana-planta.

2.2 Anatomia foliar e do colmo

Para a anatomia de folhas, foram coletadas amostras da região mediana da primeira folha completamente expandida e, no colmo, foram retiradas porções centrais e de tamanho homogêneo, as quais foram fixadas e preservadas em etanol 70%. As análises foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal, no Departamento de Biologia e no Laboratório de Cultura de Tecidos, no Departamento de Agricultura da UFLA. Secções transversais (face abaxial e adaxial) do limbo foliar e paradérmicas da folha foram submetidas à clarificação em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) e lavagem em água destilada. As secções transversais foram coradas com solução safrablau (safranina 1% e azul de astra 0,1% 7:3) e as secções paradérmicas, coradas com safranina 1% e, posteriormente, montadas em lâminas semipermanentes com água glicerinada.

Foram avaliadas 15 secções transversais e 40 paradérmicas (20 em cada face) para cada cultivar/espécie de cana-de-açúcar. As secções foram registradas

em microscópio óptico equipado com uma câmera Moticam 4 MP e visualizadas no computador, com auxílio do programa Belview.

Nas secções transversais foram avaliadas as espessuras do limbo foliar, a distância entre feixes vasculares, o número de feixes, o número de células buliformes, as espessuras da cutícula e a epiderme abaxial e adaxial.

Nas secções paradérmicas nas faces adaxial e abaxial das folhas foram obtidas a densidade estomática (número de estômatos.mm⁻²), os diâmetro polar dos estômatos e diâmetro equatorial e a relação entre estas duas últimas variáveis.

Para análise do colmo, foram retiradas secções centrais do entrenó, sendo avaliadas 15 secções centrais dos colmos de cada indivíduo e estas foram coradas com solução safrablau (safranina 1% e azul de astra 0,1% 7:3).

A variáveis analisadas foram níveis da matiz azul (celulose) e da vermelha (lignina, suberina e cutina). A análise das imagens foi realizada pela técnica RGB (Red, Green, Blue) e por meio da ferramenta histograma do software *Adobe® Phtoshop®* CS3 versão 10.0. A análise computacional RGB aplicada à histoquímica permite a identificação de diversas cores por meio das cores básicas iniciais: vermelha (*red*), verde (*green*) e azul (*blue*).

Todas as medições para anatomia foram feitas pelo programa de análise de imagens UTHSCSA ImageTool (University of Texas, San Antonio, USA), utilizando-se calibrações feitas com régua microscópica fotografada nos mesmos aumentos das fotomicrografias.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa Sisvar® (FERREIRA, 2011) e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Para análise de *cluster* utilizou-se uma matriz de dados agrupados pela técnica de ligação de média de grupos (*Unweightes Pair-Group Method using Arithmetic Averages*, UPGMA), empregando como medida de dissimilaridade a matriz de distância euclidiana média que é dada por

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_j (Y_{ij} - Y'_{ij})^2}$$

Define-se a distancia euclidiana média entre o par de genótipos i e i' , considerando Y_{ij} a observação no i -ésimo genótipo (cultivar e variedade) para a j -ésima característica,

A partir desta análise foi gerado um dendrograma. Para isso, consideraram-se, inicialmente, as 19 cultivares/espécies, que foram, então, agrupadas de forma sucessiva, formando, assim, pares de indivíduos mais próximos. Inicialmente, agruparam-se os dois indivíduos de menor distância euclidiana média. A cada grupo formado, era, então, reconstruída a matriz de similaridade, definindo a distância média entre o novo grupo com cada um dos demais, usando, para tanto, a média entre os valores individuais de dissimilaridade dos indivíduos de um dos grupos com cada um dos outros grupos (MEYER, 2002). Esse processo se repetiu até a reunião de todos os indivíduos em um único grupo, formando o dendrograma como representações das afinidades e das diferenças anatômicas entre os indivíduos estudados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferenças estatísticas para todas as variáveis analisadas. Na Tabela 1 é possível visualizar que os estômatos com maior diâmetro polar estão presentes na cultivar SP 842025, tanto da face abaxial quanto da adaxial. Porém, neste último caso, tal medida não diferiu das cultivares CTC 9 e da RB 925211.

Tabela 1 Diâmetro polar e equatorial de estômatos das faces adaxial e abaxial de espécies e cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). UFLA, Lavras, MG, 2013

Cultivar	Diâmetro polar (μm)		Diâmetro equatorial (μm)	
	Face Aba	Face Ada	Face Aba	Face Ada
CO 143	52,91 e	50,68 e	28,72 c	28,21 d
CTC 1	55,11 c	53,45 c	28,46 c	26,50 e
CTC 2	50,02 e	54,28 c	26,87 d	26,23 e
CTC 7	46,90 f	52,65 d	32,24 a	30,46 b
CTC 8	51,98 d	54,01 c	26,88 d	26,52 e
CTC 9	56,57 b	58,66 a	31,38 b	27,30 e
CTC 14	56,26 b	55,34 c	29,41 c	26,77 e
CTC 15	58,31 b	60,09 a	30,37 b	28,71 d
CTC 16	56,60 b	57,74 b	31,39 b	30,39 b
RB 855453	47,52 f	46,92 f	31,39 b	32,60 a
RB 867515	48,58 e	51,95 d	28,60 c	26,95 e
RB 925211	57,2 b	59,62 a	28,03 c	26,77 e
RB 925345	49,75 e	52,03 d	31,48 b	28,98 c
SP 891115	45,30 g	50,89 e	28,42 c	28,25 d
SP 801842	54,83 c	56,58 b	32,11 a	31,60 a
SP 813250	45,87 g	49,92 e	33,16 a	29,41 c
SP 842025	62,43 a	60,32 a	25,72 d	26,32 e
<i>S. officinarum</i>	40,12 i	36,66 h	28,60 c	26,91 e
<i>S. sinensis</i>	41,90 h	36,49 h	30,23 b	27,31 e
CV(%)	5,16	4,80	7,79	6,40

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

A espécie *S. officinarum* apresentou o menor diâmetro polar nas duas faces e não diferiu da *S. sinensis* (Figura 1). Esse resultado revela uma adequada relação com o conteúdo de DNA, que também é menor, se comparado ao das demais espécies e cultivares.

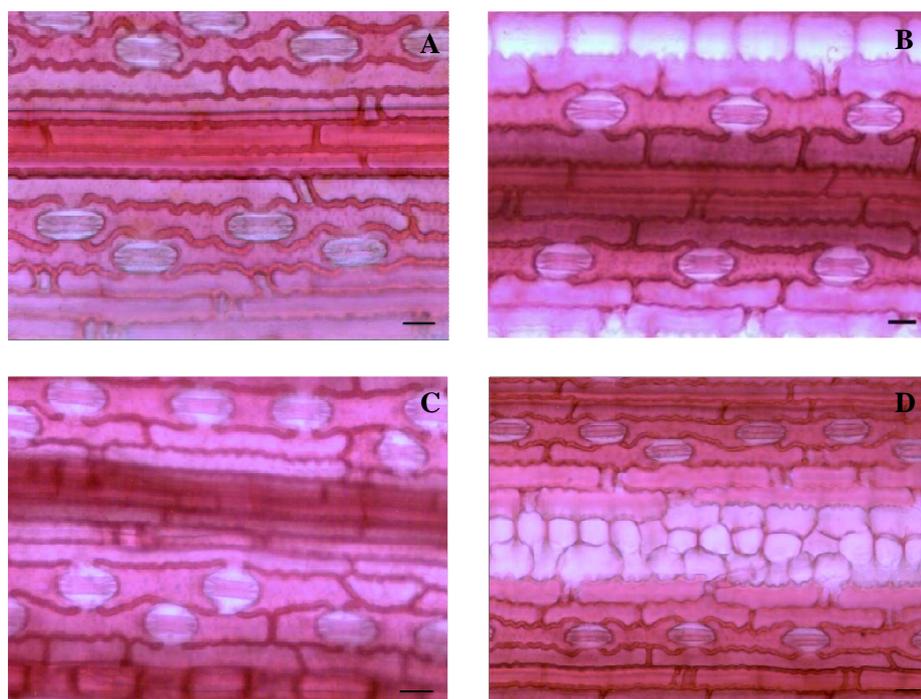


Figura 1 Fotomicrografias de espécies e cultivares de cana-de-açúcar. A - SP 842025 face abaxial; B - RB 855453 face adaxial; C - CTC 7 face abaxial e D - CTC 1 face adaxial. Barras de 20 µm. UFLA, Lavras, MG, 2013

Considerando o diâmetro equatorial, a cultivar SP 801842 apresentou os maiores valores nas duas faces, tendo, na face abaxial, sido estatisticamente igual ao das cultivares CTC 7 e SP 813250 e, na face adaxial, igual ao da cultivar RB 855453 (Tabela 1 e Figura 1).

Os diâmetros polar e equatorial estão intimamente relacionados com a maior capacidade de difusão de CO₂ e a menor perda de água via estômatos. Estômatos com maior diâmetro polar e menor diâmetro equatorial são relativamente mais eficientes e permitem ao vegetal uma rapidez maior nos processos de abertura e fechamento estomático (LINO, 2011). Esta pode ser uma adaptação vegetal a regiões onde há presença de estresse hídrico. Já a presença de estômatos menores é comum em condições de alta luminosidade (SHIELDS, 1950).

Por ser uma variável com alta plasticidade fenotípica, resultados divergentes são encontrados na literatura, como, por exemplo, os encontrados por Ullah et al. (2011), que afirmam que o comprimento (diâmetro polar) dos estômatos da espécie *S. sinensis* varia entre 30-36 µm. Este valor é inferior ao observado neste trabalho, possivelmente devido à divergência entre os climas locais, sendo que as plantas avaliadas neste trabalho se encontravam no clima de Lavras, MG.

Tanto na face adaxial quanto na abaxial, a espécie *S. officinarum* apresentou a maior densidade estomática, como pode ser observado na Tabela 2. A espécie *S. sinensis* apresentou o menor valor para esta variável nas duas faces, enquanto, na face adaxial, as cultivares CTC 9, RB 855453, RB 867515, SP 801842 e SP 842025 também apresentaram valores inferiores.

A cultivar SP 842025 tem maior capacidade de difusão de CO₂ e menor perda de água via estômatos nas duas faces, pois o diâmetro polar:diâmetro equatorial é maior para esta cultivar. A cultivar RB 925211 também apresentou habilidade superior de acordo com tal relação, porém, somente na face adaxial (Figura 2). Quanto maior for a relação diâmetro polar:diâmetro equatorial, a captação do CO₂ ocorre de forma mais eficiente, ou seja, sem grandes perdas de água em decorrência do tempo gasto no processo de abertura e fechamento dos estômatos (PEREIRA, 2008).

Tabela 2 Densidade estomática e relação diâmetro polar:diâmetro equatorial dos estômatos da faces adaxial e abaxial de espécies e cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). UFLA, Lavras, MG, 2013

Cultivar	Densidade estomática		Diâmetro polar: diâmetro equatorial	
	Face Aba	Face Ada	Face Aba	Face Ada
CO 143	95,27 c	69,69 b	1,86 d	1,80 e
CTC 1	100,33 c	63,80 b	1,96 c	2,02 c
CTC 2	100,60 c	56,76 c	1,87 d	2,08 c
CTC 7	108,19 b	56,48 c	1,47 g	1,73 e
CTC 8	113,53 b	57,60 c	1,94 c	2,04 c
CTC 9	81,50 d	49,17 d	1,87 d	2,16 b
CTC 14	99,48 c	59,57 c	1,96 c	2,08 c
CTC 15	84,87 d	49,17 d	1,94 c	2,09 c
CTC 16	82,06 d	57,60 c	1,84 d	1,90 d
RB 855453	99,20 c	47,49 d	1,52 g	1,44 f
RB 867515	92,17 c	52,54 d	1,70 e	1,94 d
RB 925211	109,31 b	55,64 c	2,06 b	2,24 a
RB 925345	120,28 b	65,48 b	1,59 f	1,80 e
SP 891115	96,67 c	60,70 c	1,60 f	1,80 e
SP 801842	90,21 d	52,83 d	1,71 e	1,79 e
SP 813250	99,76 c	80,09 a	1,40 h	1,70 e
SP 842025	86,84 d	49,17 d	2,46 a	2,31 a
<i>S. officinarum</i>	134,61 a	75,60 a	1,40 h	1,37 f
<i>S. sinensis</i>	53,67 e	53,67 d	1,34 h	1,34 f
CV(%)	15,87	20,59	9,17	8,06

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Em geral, os indivíduos com menor valor da relação diâmetro polar:diâmetro equatorial têm também um maior diâmetro polar. Uma adaptação encontrada para elevar as taxas de condutância estomática e fotossintética das plantas é a presença de um maior número de estômatos, como observado para *S. officinarum*, em ambas as faces. Isso, por um lado, ocasiona efeito negativo, principalmente quando estes valores são muito altos, já que o aumento do número de estômatos com menor relação diâmetro polar:diâmetro equatorial

pode levar ao aumento de perda de água pela planta (Tabela 2), mas pode ser benéfico, já que, em C4, há maior evaporação, acarretando também maior difusão de HCO_3^- , com maior aproveitamento de CO_2 pela PEPcase (fosfoenolpiruvato carboxilase) e, também, as taxas elevadas de evaporação proporcionam maior fluxo de nutrientes .

As espécies analisadas (*S. officinarum* e *S. sinensis*) apresentaram os menores valores para a relação diâmetro polar:equatorial, o que pode ser explicado pelo fato de as cultivares comerciais serem indivíduos melhorados a partir desta espécie e que, em decorrência disso, apresentam, talvez, maior tolerância à seca

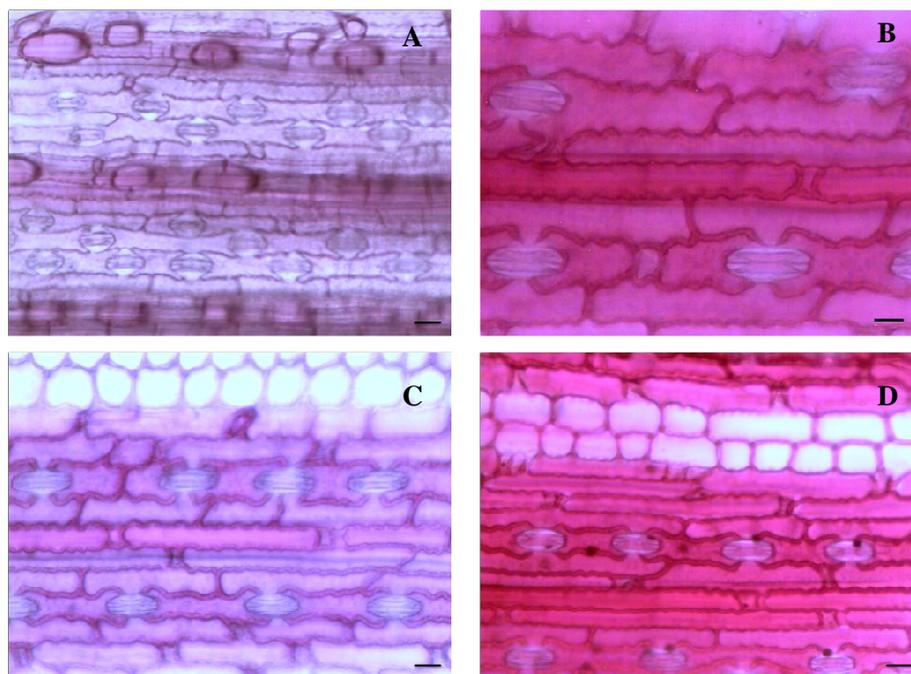


Figura 2 Fotomicrografias de espécies e cultivares de cana-de-açúcar. A – *S. officinarum* face abaxial; B – CTC 9 face adaxial; C – RB 925211 face adaxial e D – RB 867515 face adaxial. Barras de 20 µm UFLA, Lavras, MG, 2013

Analisando-se a espessura do limbo foliar, observa-se que as folhas mais espessas, dentre as estudadas, foram as das cultivares CTC 1, CTC 8, CTC 9, CTC 15 e SP 801842 (Tabela 3 e Figura 3).

Tabela 3 Espessura do limbo foliar (ELF), distância entre feixes (DEF), número de feixes vasculares (NF), número de células buliformes (NCB) de espécies e cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). UFLA, Lavras, MG, 2013

Cultivar	ELF (µm)	DEF (µm)	NF	NCB
CO 143	461,48 d	149,49 b	3,30 b	5,30 b
CTC 1	647,76 a	158,23 b	3,10 c	7,70 a
CTC 2	494,36 c	159,18 b	3,50 b	6,00 b
CTC 7	595,81 b	177,88 a	3,60 b	5,90 b
CTC 8	636,90 a	155,88 b	3,40 b	8,40 a
CTC 9	642,74 a	160,95 b	2,60 c	3,40 b
CTC 14	593,75 b	180,09 a	3,10 c	9,20 a
CTC 15	647,76 a	158,23 b	3,10 c	7,70 a
CTC 16	568,94 b	181,15 a	3,50 b	8,40 a
RB 855453	552,14 b	182,87 a	2,80 c	4,10 b
RB 867515	569,42 b	143,99 b	3,90 b	5,30 b
RB 925211	595,37 b	178,40 a	2,90 c	3,40 b
RB 925345	508,27 c	140,95 b	3,50 b	5,40 b
SP 891115	188,82 f	53,68 d	4,70 a	8,50 a
SP 801842	667,14 a	207,79 a	2,90 c	5,40 b
SP 813250	303,15 e	118,14 c	2,60 c	4,80 b
SP 842025	179,72 f	53,91 d	4,80 a	6,80 a
<i>S. officinarum</i>	497,45 c	159,64 b	3,80 b	10,10 a
<i>S. sinensis</i>	341,70 e	106,29 c	4,60 a	9,10 a
CV(%)	9,81	21,17	25,34	38,13

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

As folhas mais finas pertencem às cultivares SP 891115 e SP 842025. Esta variável está diretamente relacionada com a taxa fotossintética, pois se espera que, em folhas com maior espessura, haja também maior número de cloroplastos (PIMENTEL, 1998). Essa característica pode variar de acordo com o ambiente, porém, como todas as plantas encontravam-se em um mesmo espaço, essa diferença encontrada pode ser explicada por diferenças genéticas.

Considerando a distância entre feixes, foram verificados, nas cultivares CTC 7, CTC 14, CTC 16, RB 855453, RB 925211 e SP 801842, os maiores valores para esta variável, o contrário do constatado nas cultivares SP 891115 e SP 842025, nas quais os feixes vasculares encontram-se mais próximos (Figura 3).

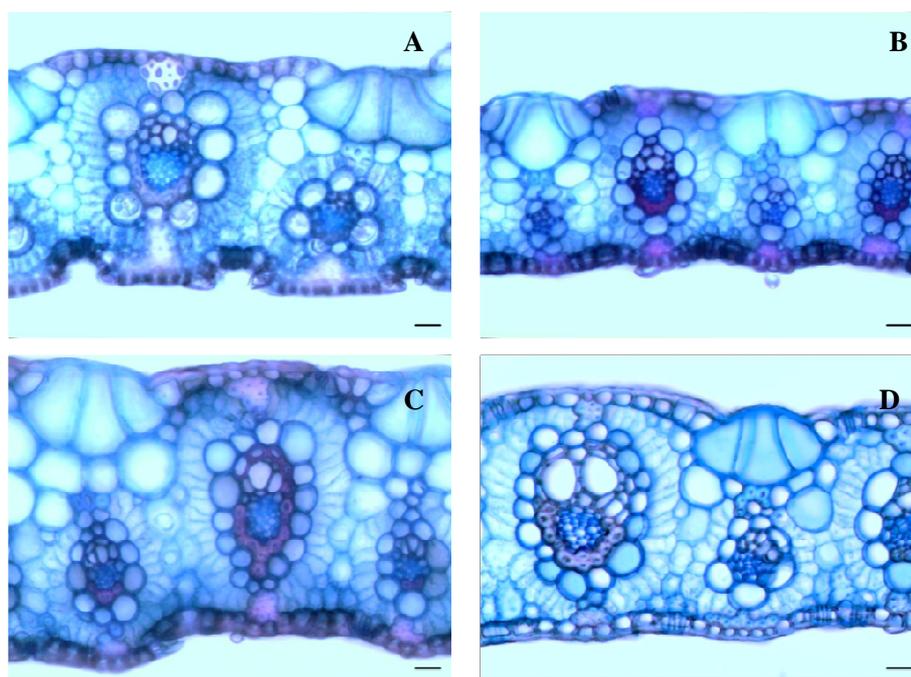


Figura 3 Fotomicrografias de espécies e cultivares de cana-de-açúcar. A – CTC 1; B – RB 867515; C – CTC 8 e D – CTC 16. Barras de 20 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2013

Essa proximidade permite maior número de feixes por área, o que assegura a condução de água e fotoassimilados, pois, se houver problema em um dos feixes (cavitação), os outros podem suprir as demandas, o que configura também uma estratégia de proteção do sistema hídrico da planta (SACK; HOLBROOK, 2006).

Em monocotiledôneas, o tecido de sustentação das folhas é formado por esclerênquima, que tem paredes celulares secundárias com espessamento, o que lhes confere resistência, aumentando, assim, a sustentação do órgão junto com as células lignificadas da epiderme das duas faces. O esclerênquima é encontrado em relativamente grandes quantidades, associado à maioria dos feixes na bainha em espécies do gênero *Saccharum* (COLBERT; EVERT, 1982). No caso das cultivares avaliadas, é possível afirmar que essa estrutura (esclerênquima + feixes) é em formato de “P”, pois as duas epidermes estão aderidas pelo esclerênquima.

Com isso, é possível fazer uma relação entre a distância dos feixes vasculares e a quantidade de esclerênquima no tecido, pois, quanto menor essa distância, maior o número de feixes e maior a quantidade de esclerênquima, o que confere grande resistência ao limbo foliar. Os maiores números de feixes vasculares podem ser observados nas cultivares SP 891115 (Figura 3) e SP 842025, valores que corroboram a informação anterior e que podem conferir a essas cultivares maior capacidade de condutância de água, minerais e fotoassimilados (Tabela 3).

Na literatura há poucas informações sobre células buliformes, sendo estas descritas como células motoras, pois, o que se sabe é que mudanças no turgor dessas células são capazes de provocar o enrolamento da lâmina foliar e, conseqüentemente, redução da perda de água por transpiração. Possivelmente, as mesmas são originárias de modificações de células da epiderme (MELO et al., 2007). Alequini et al. (2006) diagnosticaram a presença de células desse tipo entre as células da epiderme de *Saccharum*. As cultivares CTC 1, CTC 8, CTC

14, CTC 16, SP 891115, SP 842025, *S. officinarum* e *S. sinensis* apresentaram o maior número de células buliformes (Tabela 3), o que, provavelmente, acarreta redução da perda de água por transpiração, devido à probabilidade maior de ocorrer o enrolamento das folhas em função da perda de turgor dessas células, que são sensíveis à umidade (SOUZA et al., 2010). As células buliformes ocorreram apenas na face adaxial da epiderme das cultivares avaliadas.

Dallewijn (1962) relata a existência de certa relação entre a anatomia da folha e o hábito de enrolamento das folhas de cana-de-açúcar. Vale ressaltar que estas células buliformes estão frequentemente associadas a células incolores que formam colunas que atravessam ou não o mesofilo para, assim, facilitar o enrolamento. Esta associação já foi observada em *Saccharum* spp. (JOARDER et al., 2010) e em espécies de Panicoidae (GUGLIERI; LONGHI-WAGNER; ZULOAGA, 2008).

A cutícula cobre as paredes periclinais externas das células epidérmicas formando um revestimento de natureza lipídica. Sua composição química é variada, sendo a cutina um dos principais componentes. As cultivares analisadas apresentam cutícula lisa e regular.

A cutícula menos espessa da face abaxial foi observada nas cultivares SP 891115, SP 813250 e SP 842025 (Tabela 4 e Figura 4). Já para a face adaxial, o mesmo foi observado na cultivar SP 891115.

Cutículas finas ou levemente espessadas são encontradas em plantas que se desenvolvem em condições mesofíticas (CUTLER; BOTHA; SREVENSON, 2011). As cultivares RB 867515 e RB 925211 apresentaram maior espessamento da cutícula em ambas as faces (Tabela 4). Esta é uma característica xerófita (CUTLER; BOTHA; SREVENSON, 2011; MENEZES; SILVA; MELO-DE-PINNA, 2006), uma vez que auxilia na proteção contra a perda de água e atua na proteção contra o excesso de luminosidade (ALQUINI et al., 2006). Outra

importante função deste revestimento é a de controlar a absorção de herbicidas (FERREIRA et al., 2007).

Considerando a epiderme na face abaxial, valores inferiores foram observados nas cultivares SP 891115, SP 813250 e SP 842025. Analisando-se este mesmo tecido, porém localizado próximo à face adaxial do limbo foliar, os menores valores foram observados para as cultivares SP 891115, SP 842025 e *S. officinarum* (Tabela 4 e Figura 4).

Tabela 4 Espessura da cutícula da face abaxial e adaxial (ECAB E ECAD), espessura da epiderme da face abaxial e adaxial (EEAB e EEAD) de cultivares e espécies de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). UFLA, Lavras, MG, 2013

Cultivar	ECAB	EEAB	ECAD	EEAD
CO 143	17,88 c	35,53 a	18,70 c	31,30 c
CTC 1	21,23 b	44,77 a	21,36 b	46,23 a
CTC 2	21,14 b	39,50 a	23,84 b	41,25 b
CTC 7	20,21 c	42,73 a	22,39 b	42,29 b
CTC 8	21,56 b	35,12 a	27,14 a	36,57 c
CTC 9	20,73 b	40,26 a	25,61 a	47,55 a
CTC 14	18,19 c	36,85 a	28,60 a	43,93 b
CTC 15	21,23 b	44,77 a	21,36 b	46,23 a
CTC 16	17,94 c	36,03 a	19,45 c	41,44 b
RB 855453	22,32 b	39,95 a	28,10 a	37,62 c
RB 867515	25,56 a	37,48 a	28,48 a	43,72 b
RB 925211	24,58 a	42,57 a	30,19 a	50,86 a
RB 925345	18,22 c	35,65 a	24,25 b	41,13 b
SP 891115	9,01 d	13,01 b	7,35 f	12,87 f
SP 801842	19,18 c	43,72 a	20,65 b	47,93 a
SP 813250	10,56 d	15,72 b	15,81 d	20,79 e
SP 842025	8,12 d	11,28 c	11,27 e	13,43 f
<i>S. officinarum</i>	20,02 c	35,77 a	12,91 e	35,37 c
<i>S. sinensis</i>	18,61 c	32,21 a	18,17 c	28,71 d
CV(%)	20,96	23,33	19,81	14,87

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Nas cultivares analisadas, esse tecido é uniestratificado em ambas as faces, a epiderme é bastante responsiva a fatores ecológicos, e as células mais estreitas deste tecido são mais resistentes à falta de água, pois são mais resistentes ao colapso (MELO et al., 2007).

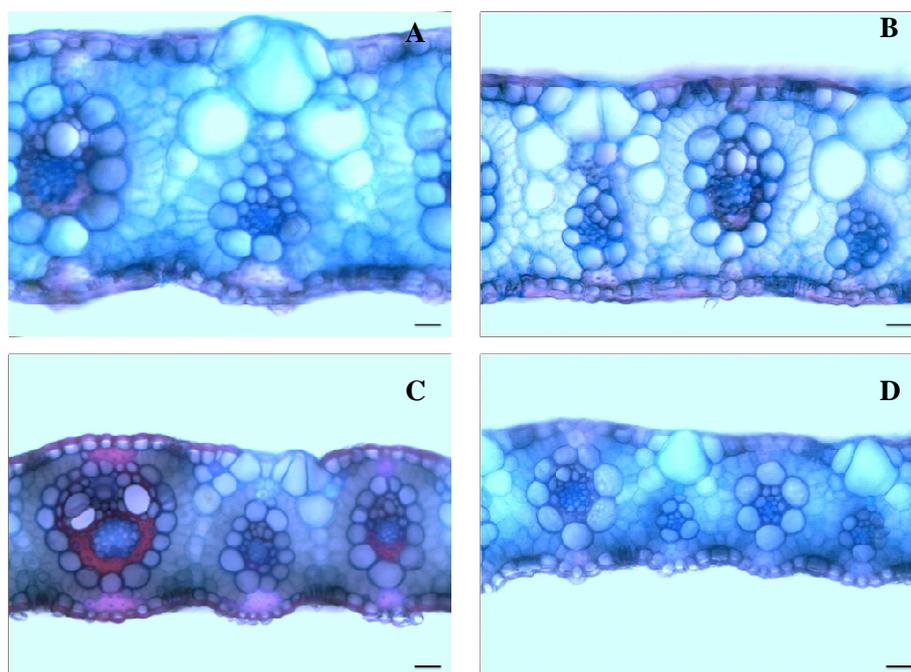


Figura 4 Fotomicrografias de cultivares/espécies de cana-de-açúcar. A – SP 813250; B – CTC 1; C – SP 842025 e D – *S. sinensis*. Barras de 20 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2013

O corante utilizado permitiu que a lignina fosse corada em vermelho e a celulose em azul. Houve diferenças estatísticas entre os teores de lignina e entre os valores de celulose observados. A cultivar CTC 7 apresentou valores inferiores para estas variáveis, se comparada com o dos demais indivíduos analisados (Gráfico 1 e Figura 5A).

A fibra da cana-de-açúcar é a parte sólida da planta, formada por pentosanas, pectinas e, principalmente, celulose, hemicelulose e ligninas, há também a ocorrência de outros componentes (FERNANDES, 2000). Com isso, a quantificação dos níveis de celulose e ligninas por meio de teste histoquímico pode ser um método de seleção indireta para teor de fibra.

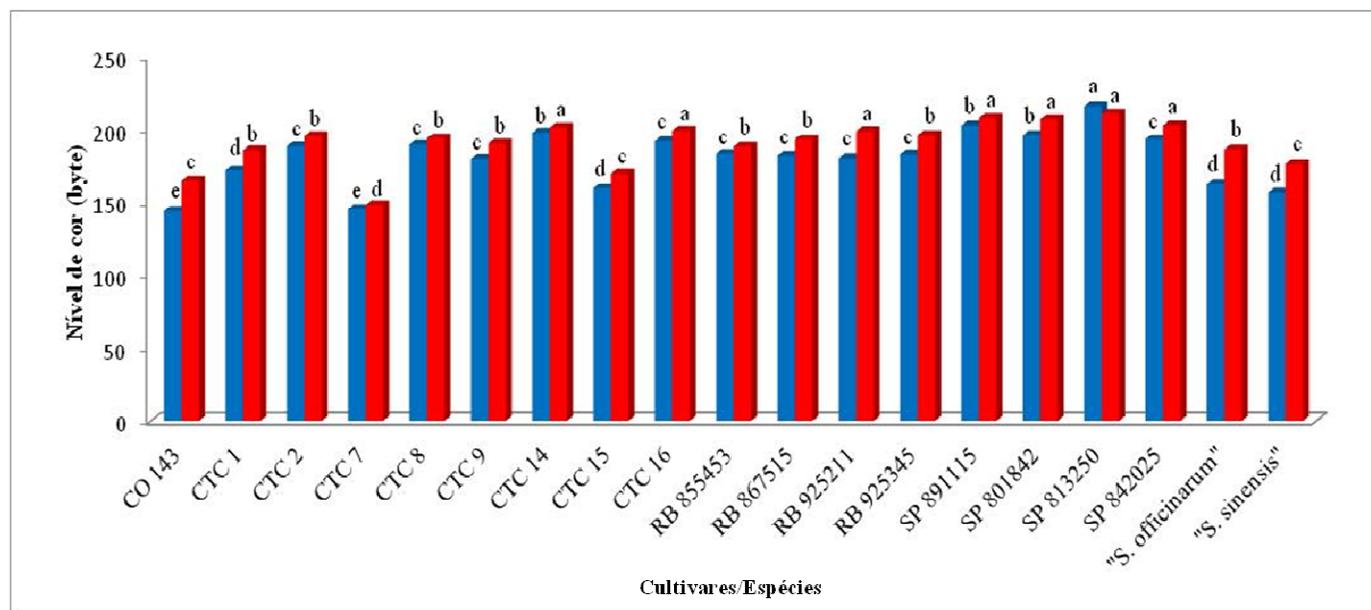


Gráfico 1 Níveis de vermelho e azul obtidos por imagem de lâminas referentes a secções do colmo de cultivares e espécies de *Saccharum* spp. UFLA, Lavras, MG, 2013

* Cultivares/espécies com letras iguais na linha pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

As cultivares de cana com baixos teores de fibra, como a 'CTC 7', são mais suscetíveis a danos mecânicos provocados pelo corte e carregamento, resultando em perdas de açúcares decorrentes da contaminação por microrganismos que passam a ter acesso à parte interna dos colmos. O baixo teor de fibra pode provocar também acamamento, o que proporciona maior quantidade de terra na matéria-prima encaminhada à indústria (TELLES, 2009). Isso, possivelmente, explica o fato de que nesta mesma cultivar foi observado um tombamento excessivo no primeiro corte (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2013).

Observando-se os níveis de vermelho, nota-se diferença estatística entre as cultivares/espécies, tendo aquelas que apresentaram maior teor de lignina sido CTC 14, CTC 16, RB 925211, SP 891115, SP 842025 e SP 813250, sendo que esta última também pertence ao grupo com maior teor de celulose (Gráfico 1 e Figura 5B). Este tipo de análise é interessante para programas de melhoramento genético, uma vez que o aumento do teor de fibra da cana reduz a eficiência da extração de caldo nas moendas (MARQUES; MARQUES; TASSO JÚNIOR, 2001), sobretudo para as condições de produção de cachaça nas quais os produtores dispõem de moendas simples e com baixa eficiência de extração (ANDRADE; CARDOSO, 2010).

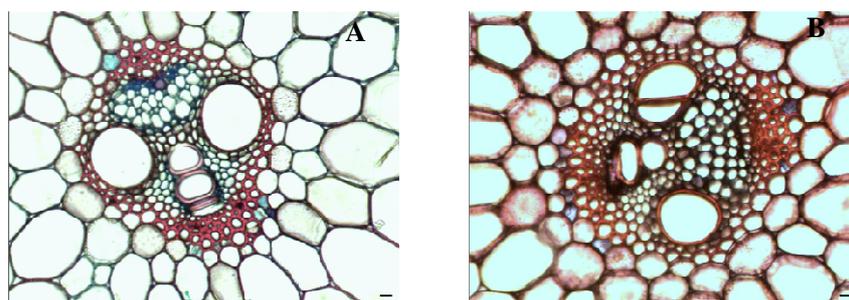


Figura 5 Fotomicrografias de colmos de cultivares de cana-de-açúcar. A – CTC 7 e B–SP 813250. Barras de 20 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2013

As paredes celulares primárias são formadas pelo crescimento celular e, nesse estágio, não ocorre deposição de lignina. Além disso, as paredes primárias são separadas umas das outras por uma lamela média depositada no primeiro estágio de crescimento celular, constituída de material amorfo (pectina) (PACIULLO, 2002). No entanto, com a expansão celular, o mecanismo favorece mudanças na parede celular. Essa transição ocorre pelo acúmulo de polissacarídeos distintos daqueles da parede primária (celulose altamente cristalina e hemicelulose) e pela deposição de lignina. O floema, por suas características, apresenta células azuis em todos os tecidos. Este é um tecido vascular constituído por elementos crivados (células vivas sem núcleo e vacúolo, em geral alongadas, que apresentam parede primária com áreas crivadas) e são livres de lignina (FERREIRA et al., 2010).

Estes mesmos autores, analisando proporções de lignina, celulose e a espessura da epiderme por meio de cortes histológicos dos colmos de cultivares de capim-elefante e estimando a herdabilidade no sentido amplo, a correlação genética e o coeficiente de variação ambiental e genético, concluíram que as cultivares superiores para esses caracteres podem ser obtidas pelo emprego de métodos simples de seleção para a melhoria das características histológicas.

De acordo com o dendrograma resultante da análise de agrupamento (Figura 6) é possível dividir os indivíduos em três grupos principais, a partir da distância euclidiana média (20), com diversos subgrupos. Os grupos estão unidos por ordem decrescente de semelhança, sendo o primeiro grupo formado pelas cultivares SP 591115, CTC 15, SP 801842, SP 813250, SP 842025 e CTC 2, que são indivíduos precoces indicados para solos fracos. O segundo grupo é formado pelas cultivares com alta produtividade, porém, com teor de fibra relativamente alto, que são RB 925211, CTC 16, CTC 14, CTC 8, RB 855453, CTC 9, RB 925345, CO 143, RB 867515, CTC 1 e pelas espécies *S. sinensis* e *S. officinarum*. A cultivar CTC 7 foi classificada em um terceiro grupo. Este

indivíduo tem como características principais a precocidade, a despalha natural e o desenvolvimento inicial rápido, porém susceptível a tombamento excessivo (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2013; HOFFMANN et al., 2008; MARIN, 2013).

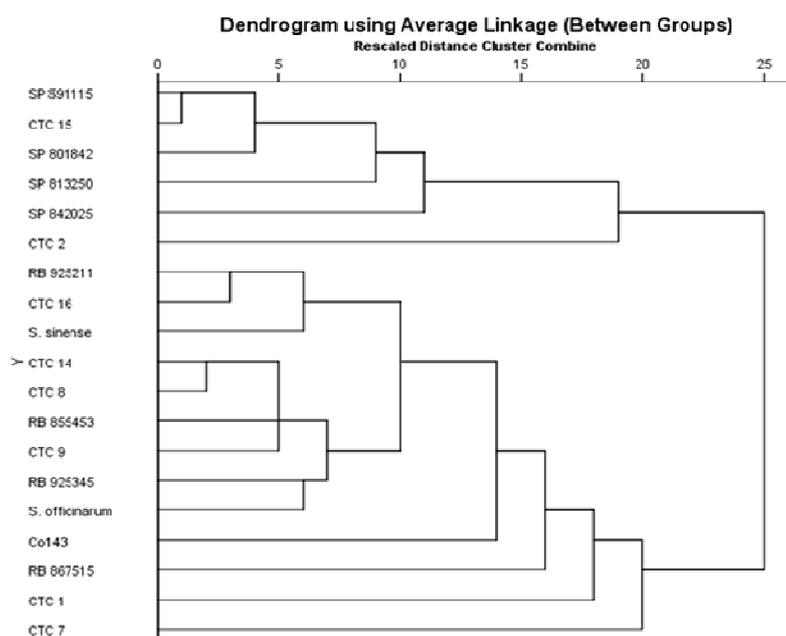


Figura 6 Dendrograma de similaridade genética, gerado a partir de 18 características anatômicas multicategóricas e calculado de acordo com a distância euclidiana média entre 19 indivíduos pertencentes ao gênero *Saccharum*, gerado pelo agrupamento UPGMA. UFLA, Lavras, MG, 2013

4 CONCLUSÃO

As cultivares/espécies podem ser separadas de acordo com as características da anatomia foliar. As espécies são menos adaptadas a estresse hídrico, se comparadas as cultivares já melhoradas, contudo, têm número elevado de células buliformes, podendo enrolar rapidamente. As cultivares SP 891115 e SP 842025, possivelmente, apresentam maiores níveis de esclerênquima, de condutância de água, de minerais e de fotoassimilados. A cultivar CTC 7 tem menores níveis de lignina e celulose, contrastando com a SP 813250. Por meio da análise de agrupamento, as cultivares CTC 7 e SP 891115 são as que têm maior dissimilaridade.

REFERÊNCIAS

AHMAD, F. et al. Taxonomic utilization of anatomical characters in tribe Andropogoneae (Poaceae) based on transverse sections of leaves. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 4, n. 14, p. 1349-1358, July 2010.

ALEQUINI, Y. et al. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 303-326.

ANDRADE, L. A. de B.; CARDOSO, M. das G. Cana-de-açúcar para produção de cachaça. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2010. p. 747-763.

ARTSCHWAGER, E. Morphology of the vegetative organs of sugarcane. **Journal of Agricultural Research**, Lahore, v. 60, n. 8, p. 505-549, Jan. 1940.

BISON, J. V. S. et al. Caracterização anatômica da lâmina foliar de quatro genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. - Poaceae). In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO DE BOTÂNICA, 19., 2012, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto de Botânica, 2012. 1 CD-ROM.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Variedades CTC**. Disponível em: <<http://www.ctcanavieira.com.br/downloads/variedades2013WEB3.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2013.

CHAVES, B. E. **Aspectos anatômicos da raiz e lâmina foliar de *Saccharum L.* (Poaceae) nativas do Brasil**. 2012. 260 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, Berkeley, v. 4, p. 62-89, Feb. 2011.

COLBERT, J. T.; EVERT, R. F. Leaf vasculature in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Planta**, Heidelberg, v. 156, n. 2, p. 136-151, Jan. 1982.

CUTLER, D. C.; BOTHA, T.; SREVENSON, D. W. **Anatomia vegetal**: uma abordagem aplicada. Porto Alegre: Artmed, 2011. 304 p.

DALLEWIJN, C. van. **Botany of sugarcane**. Waltham: The Chronica Botanica, 1962. 371 p.

FERNANDES, A. C. **Cálculos na Agroindústria da cana de açúcar**. Piracicaba: STAB, 2000. 193 p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FERREIRA, E. A. et al. Leaf blade quantitative anatomy of sugarcane cultivars and clones. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 25, n. 1, p. 25-34, jan./mar. 2007.

FERREIRA, G. D. G. et al. Histologia do colmo de clones de capim-elefante na região do agreste de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 11, n. 1, p. 36-47, jan./mar. 2010.

GUGLIERI, A.; LONGHI-WAGNER, H. M.; ZULOAGA, F. O. Anatomia foliar das espécies de *Panicum* L. subg. *Panicum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) ocorrentes no Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 279-293, jul./dez. 2008.

HOFFMANN, P. H. et al. **Variedades RB de cana-de-açúcar**. Araras: CCA/UFSCar, 2008. 30 p.
INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Previsão de safra**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em:
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=1&z=t&o=26&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1>>. Acesso em: 26 maio 2013.

JOARDER, N. et al. Leaf blade and midrib anatomy of two sugarcane cultivars of Bangladesh. **Journal of Bio-Science**, Bangladesh, v. 18, p. 66-73, May 2010.

JULIEN, M. H. R.; IRVINE, J. E.; BENDA, G. T. A. Anatomía, morfología, y fisiología de la caña de azúcar. In: RICAUD, C. et al. (Ed.). **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 18-20.

KUMAR, C. A. S. et al. Pharmacognostical and preliminary phytochemical investigations on the stem of *Saccharum spontaneum*. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Nsukka, v. 1, n. 3, p. 129-136, May 2009.

LINO, L. O. **Características anatômicas e fisiológicas de genótipos de sorgo contrastantes para tolerância à seca**. 2011. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

MARIN, F. R. **Variedades**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2013. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html>. Acesso em: 10 ago. 2013.

MARQUES, M. O.; MARQUES, T. A.; TASSO JÚNIOR, L. C. **Tecnologia do açúcar: produção e industrialização da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 2001. 166 p.

MELO, H. C. et al. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 145-153, abr. 2007.

MENEZES, N. L.; SILVA, D. C.; MELO-DE-PINNA, G. F. A. Folha. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 303-326.

METCALFE, C. R. **Anatomy of the monocotyledons: Gramineae**. Oxford: Clarendon, 1960. v. 1, 794 p.

MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. 118 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

PACIULLO, D. S. C. Características anatômicas relacionadas ao valor nutritivo de gramíneas forrageiras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 357-364, 2002.

PEREIRA, F. J. **Caracterização das modificações morfo-anatômicas e bioquímicas, em ciclos de seleção do milho saracura, para tolerância ao encharcamento do solo**. 2008. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

PIMENTEL, C. **Metabolismo do carbono na agricultura tropical**. 9. ed. Seropédica: EDUR, 1998. 150 p.

SACK, L.; HOLBROOK, N. M. Leaf hydraulics. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 361-381, June 2006.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2001. 259 p.

SHIELDS, L. M. Leaf xeromorphy as related to physiological and structural influences. **The Botanical Review**, New York, v. 16, p. 399-447, Oct. 1950.

SOUZA, T. C. et al. Leaf plasticity in successive selection cycles of 'Saracura' maize in response to periodic soil flooding. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 16-24, jan. 2010.

STEINER, J. J.; SANTOS, G. G. Adaptive ecology of *Lotus corniculatus* L. Genotypes: I., plant morphology and RAPD marker characterizations. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 552-563, Mar./Apr. 2001.

TELLES, M. R. Níveis de fibra e umidade em cultivares de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 21., 2009, São José do Rio Preto. **Anais...** São José do Rio Preto: UNESP, 2009. p. 8728-8730.

ULLAH, Z. et al. Systematic implications of foliar epidermis in Andropogoneae (Poaceae) from Hindukush-himalayas Pakistan. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 5, p. 949-957, Mar. 2011.

VENKATRAMAN, R. S. T. S. Sugarcane root systems: studies in development an anatomy. In: INDIAN SCIENCE CONGRESS, 9., 1922, Madras. **Proceedings...** Madras: ICS, 1922. p. 381-395.

CAPÍTULO 3

Confiabilidade das análises de citometria de fluxo e variação no conteúdo de DNA em cana-de-açúcar

RESUMO

A citometria de fluxo é definida como uma técnica fácil e rápida de determinação do conteúdo de DNA, dentre outras características. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a confiabilidade da análise de citometria de fluxo e, por meio desta técnica, diferenciar, de acordo com o conteúdo relativo de DNA, cultivares e espécies de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp). Para isso, foram analisadas 16 cultivares e 3 espécies pertencentes a este gênero. Para a determinação de um protocolo confiável, foram avaliados três tampões de extração (LB01, Marie e Tris.MgCl₂), presença e ausência de RNase, seis doses de iodeto de propídeo (5, 10, 15, 20, 25 e 30 µL), quatro períodos de exposição ao iodeto de propídeo (0, 5, 10 e 20 minutos) e sete padrões de referência externos (ervilha, fava, milho, rabanete, centeio, soja e tomateiro), em que foram determinados o coeficiente de variação (CV) e o conteúdo de DNA (CD). Para análise estatística, utilizaram-se os programas Sisvar[®] e XLSTAT[®]. São recomendados o tampão de extração Marie e a utilização de, no mínimo, 15 µL de iodeto de propídeo. Não se deve realizar a leitura das amostras imediatamente após a adição deste. O uso de RNase é dispensável e, como padrão externo de referência, deve ser utilizado o tomateiro. Os indivíduos analisados podem ser separados em quatro grupos, em função do conteúdo de DNA.

Palavras-chave: *Saccharum* ssp. Citômetro. Metodologia.

ABSTRACT

Flow cytometry is defined as an easy and fast technique for determining the DNA content, as well as other characteristics. The objective of this study was to evaluate the reliability of flow cytometry analysis, and by means of this technique, differentiate, according to the relative DNA content, species and cultivars of sugarcane (*Saccharum* sp.) For this, we analyzed 16 varieties and 3 species belonging to this genus. For determination of a reliable protocol, we evaluated three extraction buffers (LB01, Marie and Tris.MgCl₂), presence and absence of Rnase, six doses of propidium iodide (5, 10, 15, 20, 25 and 30 µL), four periods of exposure to propidium iodide (0, 5, 10 and 20 minutes) and seven external reference standards (peas, beans, corn, radish, rye, soybean and tomato), for which the coefficient of variation (CV) and DNA content (CD) were determined. For statistical analysis, we used the programs Sisvar[®] and XLSTAT[®]. The Marie extraction buffer and use of at least 15 µL of propidium iodide are recommended. One should not perform the reading of samples immediately after their. The use of RNase is dispensable, and tomato should be used as an external reference standard. The analyzed samples can be separated into four groups on the basis of DNA content.

Keywords: *Saccharum* ssp. Cytometer. Methodology.

1 INTRODUÇÃO

A cultivar é o potencial tecnológico de maior importância, tanto para a melhoria na qualidade da matéria-prima quanto para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar. O melhoramento genético é a base da produção, por meio da qual são obtidas novas cultivares que promovem ganhos acentuados de produtividade e qualidade. Atualmente, no Brasil, existem quatro programas com esta finalidade, no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Canavialis (Monsanto) e Rede Interinstitucional de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA) (BARBOSA et al., 2005).

No melhoramento de espécie de reprodução vegetativa, como a cana-de-açúcar, o processo de seleção do genótipo superior visando à sua clonagem inicia-se logo na população segregante (F1), gerada a partir da hibridação de genitores previamente selecionados. Pesquisadores buscam melhorar a eficiência das metodologias utilizadas nesse processo de seleção, o qual ocorre em âmbito de indivíduo (PEDROZO, 2005).

A citometria de fluxo é uma ferramenta útil nesse tipo de seleção, possibilitando a estimativa do conteúdo de DNA e do tamanho genômico, e pode ser definida como um método novo e rápido para determinar, de forma eficiente e reprodutível, o conteúdo relativo de DNA nuclear e o nível de ploidia de um grande número de espécies (vegetais e animais) (OCHATT, 2013).

Variabilidades intraespecíficas já foram relatadas nas espécies *Arabidopsis thaliana* (SCHMUTHS et al., 2004), *Panicum virgatum* (COSTICH et al., 2010), *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *europaea* (BRITO et al., 2008) e *Chenopodium quinoa* (KOLANO et al., 2012).

No entanto, há pouca informação disponível sobre o conteúdo de DNA nuclear e o tamanho do genoma em cana-de-açúcar. Essa informação pode ser valiosa para a compreensão dos fenômenos citogenéticos em cruzamentos (BURNER, 1997) e complementar os programas de desenvolvimento de germoplasma convencionais e moleculares que visam aumentar a diversidade genética e a troca de gene, auxiliando na seleção de genótipos superiores. Contudo, os benefícios da técnica de citometria de fluxo ainda não foram explorados em cana-de-açúcar (EDMÉ et al., 2005) e, segundo Zhang et al. (2012), em contraste com os estudos sobre ploidia e número de cromossomos, pouco se sabe sobre a variação do tamanho do genoma, dentro e entre espécies *Saccharum*.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a confiabilidade da análise de citometria de fluxo e, por meio desta técnica, diferenciar, de acordo com o conteúdo relativo de DNA, espécies e cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para analisar a confiabilidade da análise de citometria de fluxo, os experimentos foram realizados com a espécie *Saccharum officinarum* e a caracterização do conteúdo de DNA foi realizada em 16 cultivares e 3 espécies de cana-de-açúcar (SP 842025, SP 801842, SP 891115, RB 925211, SP 813250, RB 867515, CTC 159, RB 925345, CTC 9, CTC 16, CTC 14, CTC 7, CTC 8, CTC 1, CTC 2, CO 413, *Saccharum. officinarum* L., *S. sinense* L. e *S. spontaneum* L.), mantidas pelo Departamento de Agricultura e localizadas no painel de cultivares de cana-de-açúcar da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os indivíduos avaliados tinham 12 meses de cultivos, cana-planta.

2.2 Preparo e extração das amostras

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos, no Departamento de Agricultura da UFLA. Com objetivo de estimar o conteúdo de DNA, foram avaliadas três amostras para cada cultivar, sendo cada uma delas considerada uma repetição. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições. As amostras vegetais utilizadas para quantificar o DNA em citômetro de fluxo eram constituídas da primeira folha completamente expandida de cada indivíduo. Foi coletada uma folha de cada planta e retirada uma pequena porção na região mediana. Os fragmentos foram embalados em sacos plásticos juntamente com algodão umedecido, identificados e levados para o laboratório.

Os coeficientes de variação foram obtidos no próprio programa de análise e o conteúdo de DNA nuclear em (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a fórmula

$$\text{DNA amostra (pg)} = \frac{\text{G1 amostra}}{\text{G1 padrão}} \times \text{DNA padrão (pg)}$$

O símbolo C corresponde ao tamanho do genoma nuclear haploide (em mega pares de base, Mpb) que foi estimado de acordo com a fórmula proposta por Bennett e Smith (1976), com a conversão de 1 pg = 980 Mbp (DOLEZEL et al., 2003).

$$\text{Tamanho do genoma (Mpb)} = \frac{[\text{Conteúdo de DNA 2C (pg)} \times 980\text{Mpb}]}{2}$$

Para avaliação da confiabilidade das análises, foram mensurados o conteúdo de DNA e o coeficiente de variação de cada análise. Para isso, foram utilizadas, aproximadamente, 20-30 mg de folhas jovens das plantas e do padrão de referência externo. Os fragmentos foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL de tampão de extração gelado, para a liberação dos núcleos (DOLEZEL; DOLEZELOVÁ; NOVÁK, 1994).

Após o processo de extração, a suspensão de núcleos foi aspirada por meio de duas camadas de gaze, com auxílio de pipeta de Pasteur, e filtrada através de uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição uma solução de 1 mg/1 mL de iodeto de propídeo.

Em todas as análises, o padrão de referência utilizado foi o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Stupické), que apresenta 1,96 pg de DNA,

exceto quando as variáveis estudadas foram o próprio padrão de referência e o tampão Marie.

2.2.1 Tampão de extração na confiabilidade das análises de citometria de fluxo

Foram testados três tampões de extração (LB01, Marie, e Tris.MgCl₂) (GALBRAITH et al., 1983).

2.2.2 Utilização de RNase na confiabilidade das análises de citometria de fluxo

Foram testados dois tipos de iodeto de propídeo, com e sem RNase (0 e 200 µg/mL).

2.2.3 Quantidade de iodeto de propídeo na confiabilidade das análises de citometria de fluxo

Foram testadas seis doses, 10, 15, 20, 25 e 30 µL, de uma solução de 1 mg/1 mL de iodeto de propídeo.

2.2.4 Tempo de exposição dos núcleos ao iodeto de propídeo na confiabilidade das análises de citometria de fluxo

Foram testados cinco tempos de exposição: 0, 5, 10, 15 e 20 minutos.

2.2.5 Padrão externo de referência na confiabilidade das análises de citometria de fluxo

Foram testados sete padrões de referência: ervilha (*Pisum sativum* L. cv. Ctirad), feijão fava (*Vicia faba* L.), milho (*Zea mays* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L. cv. Saxa), centeio (*Secale cereale* L.), soja (*Glycine max* L.) e tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Stupické).

Na Tabela 1 são apresentados os conteúdos de DNA dos padrões de referências utilizados.

Tabela 1 Conteúdo de DNA dos padrões de referência utilizados. Lavras, MG, 2011

Padrão de referência	Conteúdo de DNA (pg)	Referência
Ervilha cv. Ctirad	9,09	Dolezel et al. (1998)
Centeio	16,19	
Feijão-fava	26,90	Dolezel, Sgorbati e Lucretti (1992)
Rabanete cv. Saxa	1,11	
Tomateiro cv. Stupické	1,96	Lysák e Dolezel (1998)
Milho	5,43	
Soja	2,05	Dolezel, Dolezelová e Novák (1994)

2.2.6 Variação no conteúdo de DNA

A partir de ensaios prévios, foram utilizadas, para a determinação do conteúdo de DNA, aproximadamente 20-30 mg de folhas jovens das plantas e de *Solanum lycopersicum* L. cv. Stupické L. (padrão de referência externo) foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL de tampão Marie gelado, para a liberação dos núcleos (DOLEZEL; BINAROVA; LUCRETTI, 1989). A

suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e filtrada através de uma malha de 50 μm . Os núcleos foram corados pela adição de 15 μL de uma solução de 1 mg/1 mL de iodeto de propídeo.

2.3 Análises estatísticas

Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro FacsCalibur (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA) e os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados estatisticamente no software FlowJo[®] 10.0.6.

Os coeficientes de variação (CV), tamanhos de genoma (Mpb) e conteúdos de DNA (pg) obtidos foram submetidos a análises de variância pelo teste F e, quando significativas, as médias dos CVs e os conteúdos de DNA (pg) foram agrupadas pelo teste de agrupamento Scott-Knott ($p \leq 0,05$) (SCOTT; KNOTT, 1974). Também foi realizado o agrupamento das amostras de acordo com a similaridade obtida por meio de conteúdo de DNA (pg), considerando-se o método de análise de coordenadas principais (ACoP), com o auxílio do software XLSTAT (ADDINSOLFT, 2013), para diferentes conteúdos de DNA, cultivares e espécies.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A confiabilidade das análises de citometria de fluxo foi mensurada de acordo com os coeficientes de variação (CVs) e conteúdos de DNA inerentes a cada análise. Galbraith et al. (2001) afirmam que o CV é um critério elementar que reflete na confiabilidade de análise de citometria de fluxo, sendo estes dois parâmetros inversamente proporcionais. Houve diferenças estatísticas entre os conteúdos de DNA e os coeficientes de variação (CVs) obtidos nas análises de citometria de fluxo utilizando-se diferentes tampões (Tabela 2). As análises realizadas com o tampão Marie apresentaram CVs estatisticamente iguais, feitas com tampão LB01 e Galbraith. Tais tampões foram capazes de manter a integridade da solução formada pelos núcleos de *S. officinarum* isolados (Figura 1). O conteúdo de DNA obtido com o primeiro tampão citado diferiu estatisticamente dos demais e mais se assemelhou ao encontrado na literatura (8,32 pg/2 C) (EDMÉ et al., 2005).

Tabela 2 Conteúdo de DNA e coeficientes de variação (CVs) das análises de citometria de fluxo em função de diferentes tampões de extração em cana-de-açúcar (*S. officinarum* L.). Lavras, MG, 2013

Tampão de extração	Conteúdo de DNA (pg)	CV (%)
Marie	8,32 a	4,22 a
LB01	7,62 b	5,04 a
Tris.MgCl ₂	3,84 c	7,91 b

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knot ($p < 0,05$)

Especificamente, o tampão Marie é formado por glicose (que mantém a integridade nuclear e previne a formação de aglomerados de núcleos), EDTA, que é usado por ligar-se a cátions bivalentes que servem como cofatores de

nucleases (enzimas que realizam a degradação de núcleos celulares) e alguns sais inorgânicos (KCl, NaCl) são adicionados à solução no intuito de manter uma estabilização iônica. O pH da solução varia dentro de um limite estreito (7,0-8,0). A presença de dois detergentes não iônicos, Triton-X-100 e o Tween 20, facilita a liberação dos núcleos dos citoplasmas, remove restos de citoplasma da superfície dos núcleos, dispersa cloroplastos e diminui a tendência de os núcleos e os fragmentos citoplasmáticos se agregarem (MARIE; BROWN, 1993). Tais características são indispensáveis para a obtenção de análises confiáveis, como verificado neste experimento.

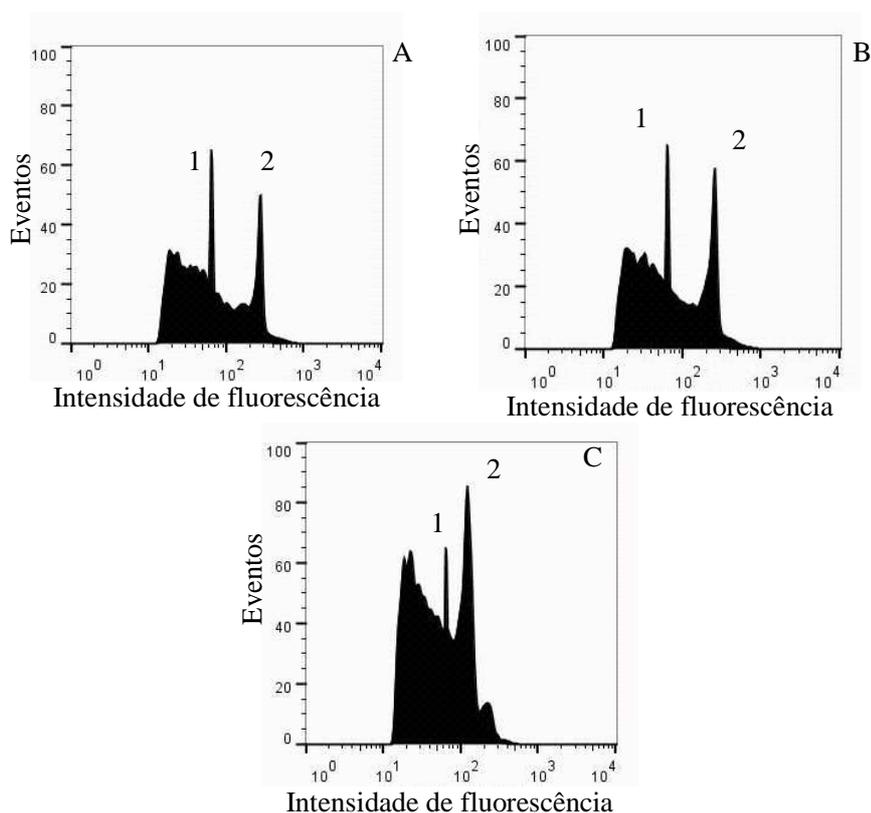


Figura 1 Histogramas de citometria de fluxo obtidos com os tampões de extração: A) Marie, B) LB01 e C) Tris.MgCl₂, em *S. officinarum* L.

Pico 1: Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Stupické) e pico 2: amostra. UFLA, Lavras, MG, 2013

Outros trabalhos testando tampões já foram realizados com *Vitis vinifera* (LEAL et al., 2006) e *Quercus suber* L. (LOUREIRO et al., 2006a), e apresentaram resultado semelhante ao deste trabalho, sendo aqueles obtidos com o tampão Marie os mais confiáveis.

Também foram verificadas diferenças estatísticas entre os conteúdos de DNA e os coeficientes de variação (CVs) obtidos nas análises de citometria de fluxo utilizando-se diferentes quantidades do fluorocromo iodeto de propídeo, com observado na Tabela 3 e na Figura 2.

Quando foram utilizados 10 µL da solução, as médias das variáveis analisadas diferiram das demais doses. Nessa quantidade de corante, o CV está acima do aceito na literatura, que é de 5% (GUIMARÃES et al., 2009). Compostos citosólicos interferem na ligação do fluorocromo com o DNA inibindo a fluorescência dos corantes, fato comum em plantas (PRICE; HODNETT; JOHNSTON, 2000). Devido a isso pode ocorrer a necessidade de maior quantidade do corante para leitura mais corretas, como visto na Tabela 3.

Tabela 3 Conteúdo de DNA e coeficientes de variação (CVs) das análises de citometria de fluxo, em função de diferentes quantidades de iodeto de propídeo (IP) em cana-de-açúcar (*S. officinarum* L.). Lavras, MG, 2013

Quantidade de IP (µL)	Conteúdo de DNA (pg)	CV (%)
10	7,26 a	5,01 b
15	7,93 b	4,00 a
20	8,05 b	4,13 a
25	8,16 b	4,30 a
30	8,16 b	4,36 a

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knot ($p < 0,05$)

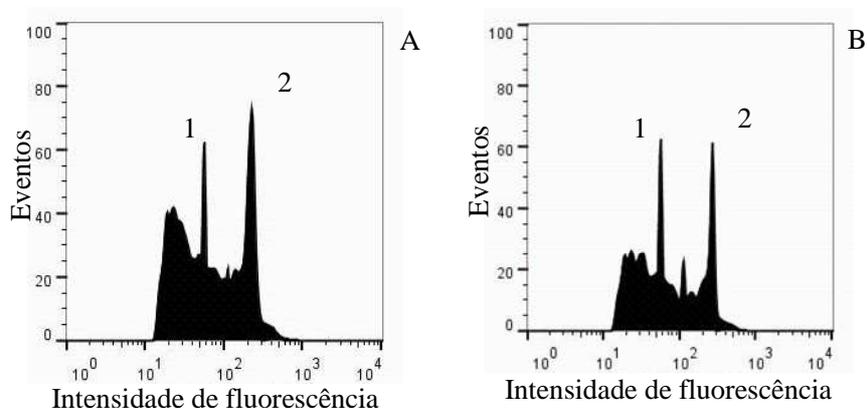


Figura 2 Histogramas de citometria de fluxo obtidos de acordo com a quantidade de iodeto de propídeo (IP). A) 10 μ L e B) 20 μ L em *S. officinarum* L. Pico 1: Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Stupické) e pico 2: amostra. UFLA, Lavras, MG, 2013

As análises com quantidade de IP variando entre 15 e 30 μ L apresentaram resultados estatisticamente iguais para as duas variáveis, o que, possivelmente, ocorreu devido à saturação do corante, isto é, em um determinado ponto, todos os núcleos estão corados e a adição de mais fluorocromos não proporciona um aumento na intensidade.

Loureiro et al. (2006b), analisando folhas de *Pisum sativum*, verificaram que 1 mL de suspensão contendo núcleos celulares encontrava-se saturado com a utilização de 750 μ L, 25 vezes mais que a maior quantidade utilizada nesse experimento. Contudo, uma solução desse tipo pode ter sido corada satisfatoriamente muito antes deste ponto.

As variáveis analisadas também apresentaram médias estatisticamente significativas para os tratamentos nos quais foram testados diferentes tempos de exposição da solução nuclear ao fluorocromo.

O CV da análise realizada imediatamente após a adição do corante foi o mais alto, resultando em estimativas menos confiáveis que aquelas determinadas nos demais tempos (Tabela 4 e Figura 3).

Para Barre et al. (1996), um período de incubação de 5 a 10 minutos é, geralmente, suficiente para saturar todos os sítios de DNA. Por mais tempo, a coloração pode levar à diminuição da fluorescência e/ou ao aumento dos níveis de resíduos, o que compromete sensivelmente as análises de citometria de fluxo.

Tabela 4 Conteúdo de DNA e coeficientes de variação (CVs) das análises de citometria de fluxo, em função de diferentes tempos de exposição (minutos) da solução nuclear ao fluorocromo iodeto de propídeo (IP), em cana-de-açúcar (*S. officinarum* L.). Lavras, MG, 2013

Tempo de exposição (min)	Conteúdo de DNA (pg)	CV (%)
0	8,24 a	5,17 b
5	8,27 a	4,00 a
10	8,42 a	4,33 a
15	8,59 b	3,83 a
20	8,64 b	4,17 a

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knot ($p < 0,05$)

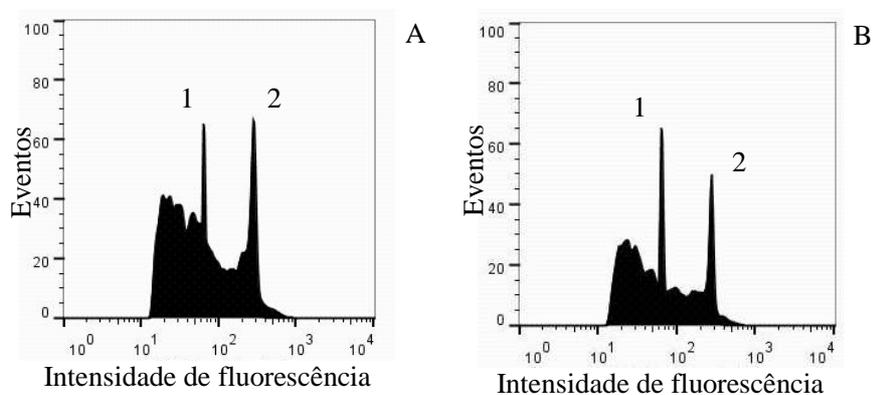


Figura 3 Histogramas de citometria de fluxo obtidos de acordo com o tempo de exposição ao iodeto de propídeo (IP). A) 0 min e B) 10 min, em *S. officinarum* L. Pico 1: Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Stupické) e pico 2: amostra. UFLA, Lavras, MG, 2013

Loureiro et al. (2006b), trabalhando com *Pisum sativum*, verificaram que, após 60 minutos de exposição da suspensão contendo os núcleos, a fluorescência começa a diminuir. Essa diminuição não foi verificada neste trabalho, talvez por não ter ocorrido o teste com tempos tão elevados, visto que o intervalo de tempo usado por esses autores não é alcançado nas análises rotineiras.

Os resultados utilizando a RNase mostraram-se indiferentes àqueles obtidos na presença desta enzima, se considerado apenas o coeficiente de variação (Tabela 5 e Figura 4). O mesmo não ocorreu para a variável conteúdo de DNA. Na ausência de RNase, os resultados apresentados se assemelham com o esperado, sendo, por isso, recomendada a ausência dessa enzima no preparo de amostras de citometria de fluxo de cana-de-açúcar

Tabela 5 Conteúdo de DNA e coeficientes de variação (CVs) das análises de citometria de fluxo, em função da RNase em cana-de-açúcar (*S. officinarum* L.). Lavras, MG, 2013

RNase	Conteúdo de DNA (pg)	CV (%)
Presença	7,73 b	4,04 a
Ausência	8,30 a	4,06 a

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knot ($p < 0,05$)

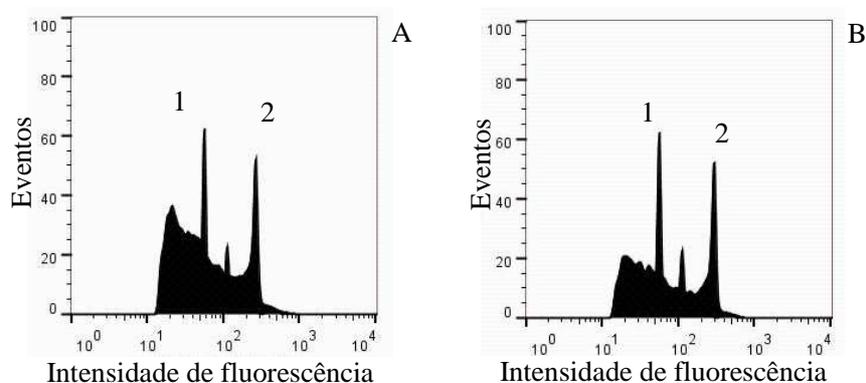


Figura 4 Histogramas de citometria de fluxo obtidos na presença de RNase (A) ou na ausência desta (B) em *S. officinarum* L. Pico 1: Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Stupické) e pico 2: amostra. UFLA, Lavras, MG, 2013

A RNase (ribonuclease), enzima também denominada de endonuclease, é responsável pela degradação de RNA (BROWN, 1999). O tratamento com enzima pode ser necessário para a determinação do conteúdo de DNA, pois alguns corantes, como o iodeto de propídeo, se ligam também ao RNA, levando a superestimativas. Isto justifica a utilização dessa proteína nesse tipo de análise.

Porém, RNase, muitas vezes, pode não ter efeito, devido à baixa quantidade de RNA. Isso ocorre nas folhas, por exemplo, podendo parecer indispensável, porém, vale salientar a sua essencialidade em tecidos ricos em RNA, tais como sementes e meristemas, o que explica os resultados obtidos, em que a presença da RNase é dispensável (GREILHUBER et al., 2007). Tal fato explica os resultados melhores na ausência ou indiferentes a RNase, observados na Tabela 5.

Houve diferenças estatísticas quando se analisou a influência do padrão de referência externo na confiabilidade de análises de citometria de fluxo, para ambas as variáveis analisadas (Tabela 6).

Tabela 6 Conteúdo de DNA da amostra e coeficientes de variação (CVs) das análises de citometria de fluxo, em função padrão de referência externo em cana-de-açúcar (*S. officinarum* L.). Lavras, MG, 2013

Padrões de referência	Conteúdo de DNA (pg) <i>S. officinarum</i>	CV (%) Padrão de referência
<i>S. cereale</i>	7,16 a	2,72 a
Tomateiro	8,09 b	3,09 a
Ervilha	**	**
Rabanete	8,69 b	5,55 c
Feijão fava	9,30 c	5,53 c
Milho	10,24 c	4,54 b
Soja	10,34 c	4,79 b

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knot ($p < 0,05$)

* Sobreposição dos picos da amostra e do padrão externo

Quando foi utilizado o rabanete, observaram-se resultados intermediários para as duas variáveis. Contudo, o CV dessa análise não é aceito, bem como o do feijoeiro, sendo ambos estatisticamente iguais (5,55% e 5,53%, respectivamente) (Tabela 6).

As análises utilizando a ervilha apresentaram sobreposição dos picos, o que se deve à proximidade dos valores de conteúdo de DNA do padrão de referência e da amostra analisada (Tabela 6 e Figura 5).

Devem-se evitar o feijão-fava (26,90 pg) e o centeio (*S. cereale* - 16,19 pg) como padrões de referência em análises de cana-de-açúcar, pois o conteúdo de DNA de ambos é muito superior ao desta espécie, podendo levar a erros no resultado. Na Tabela 1 estão citados os conteúdos de DNA (em pg) dos padrões de referência utilizados neste experimento.

Price e Johnston (1996) recomendaram que o padrão de referência utilizado na citometria de fluxo deve apresentar valor de DNA próximo ao da amostra cujo conteúdo é desconhecido, para evitar a não linearidade, mas não deve haver sobreposições dos picos.

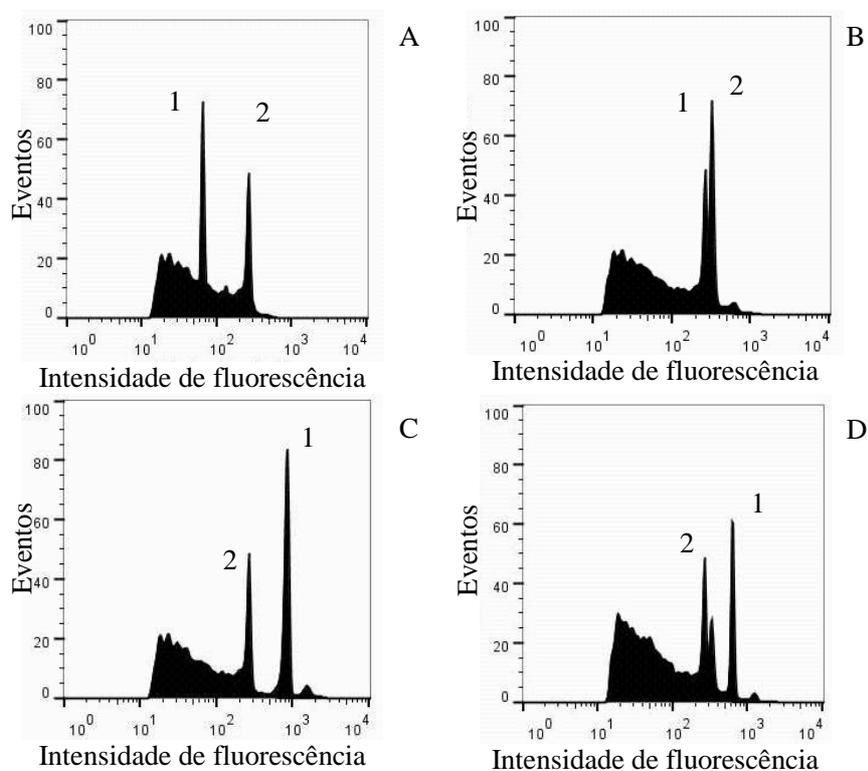


Figura 5 Histogramas de citometria de fluxo obtidos com diferentes padrões externos. Pico 1: *S. officinarum* L. e Pico 2:

A) tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.),

B) ervilha (*Pisum sativum* L.),

C) feijoeiro (*Vicia faba* L.),

D) soja (*Glycine max* L.). UFLA, Lavras, MG, 2013.

Se forem considerados o conteúdo de DNA e o tamanho do genoma, foram detectadas grandes diferenças no teor de DNA (2C), variando de 12,12 pg (CTC 7) a 7,70 pg (*S. spontaneum* L.) (Tabela 7).

Os indivíduos de *Saccharum* spp. analisados podem ser divididos em 4 grupos, pelo método de Scott-Knott. O maior grupo formado pelas cultivares CTC 7, CTC 9, CTC 2, SP 801842, CTC 8, SP 813250, SP 842025, RB 925211, CTC 14 e RB 925345 também é o agrupamento no qual foram verificadas as

maiores médias de conteúdo de DNA e tamanho do genoma, variando entre 12,12-11,27 pg/2C e 5.938,8-5.522,3 Mpb por núcleo haploide, respectivamente. Seguindo a ordem decrescente, o próximo agrupamento é formado pelos indivíduos RB 867515, *S. sinense*, CTC 15, CTC 16, CTC 1, SP 891115 e CO 143, nos quais os valores de conteúdo de DNA e tamanho do genoma observados variaram de 11,09 a 10,15 pg/2C e 5.434,1 a 4.973,5 Mpb/1C. As espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum* formaram um grupo à parte, com 8,42 e 7,70 pg/2C de DNA e 4.125,8 e 3.773,0 Mpb/1C (Tabela 7).

Tabela 7 Conteúdo de DNA e tamanho do genoma de variedades e espécies de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). UFLA, Lavras, MG, 2013

Cultivar/espécie	Conteúdo de DNA (pg)	Tamanho do genoma (Mpb)	Scott-Knott (5%)
CTC 7	12,12±0,36	5938,8	a
CTC 9	12,05±0,21	5904,5	a
CTC 2	11,99±0,40	5875,1	a
SP 801842	11,79±0,35	5777,1	a
CTC 8	11,77±0,37	5767,3	a
SP 813250	11,75±0,55	5757,5	a
SP 842025	11,63±0,26	5698,7	a
RB 925211	11,53±0,26	5649,7	a
CTC 14	11,31±0,48	5541,9	a
RB 925345	11,27±0,39	5522,3	a
RB 867515	11,09±0,45	5434,1	b
<i>S. sinense</i>	11,07±0,38	5424,3	b
CTC 15	11,10±0,40	5439,0	b
CTC 16	10,50±0,30	5145,0	b
CTC 1	10,47±0,13	5130,3	b
SP 891115	10,46±3,76	5125,4	b
CO 143	10,15±0,30	4973,5	b
<i>S. officinarum</i>	8,42±0,50	4125,8	c
<i>S. spontaneum</i>	7,70±0,32	3773,0	c

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knot ($p < 0,05$)

As análises de citometria de fluxo mostraram apenas um pico, correspondente à fase G0/G1 (nível 2C) do ciclo celular. Os picos correspondentes à fase G2+M (M=mitose) (nível 4C) não foram detectados, indicando ausência de células em divisão ou endoploidia (aumento do número de cromossomos, ocasionado pela replicação sem posterior divisão celular) nos indivíduos de cana-de-açúcar avaliados.

Os resultados aqui apresentados evidenciam que a cana-de-açúcar tem um genoma de tamanho grande e variável (7,70-12,12 pg/2C). O aumento do conteúdo de DNA observado em algumas cultivares comerciais pode não necessariamente afetar o fenótipo dessas populações interespecíficas e, provavelmente, são oriundas de autoduplicação (duplicação do genoma sem que ocorra a divisão celular).

As cultivares comerciais foram praticamente classificadas no mesmo grupo, o que indicaria que o tamanho do genoma é estável em cultivares comerciais (as demais 15 cultivares foram divididas em apenas dois grupos). Segundo dados encontrados na literatura, essa estabilidade pode ser observada até mesmo depois de 12 gerações de inter cruzamento de materiais avançados em programas de melhoramento genético (EDMÉ et al., 2005).

Tal estabilidade do genoma pode ser explicada pelo fato de a maioria das cultivares de cana-de-açúcar presentes em todo o mundo ser derivada do inter cruzamento de uma progênie composta por poucos parentes ou por pressão de seleção indireta. Estabilidade similar é observada em outras culturas, como a banana (*Musa* spp.) (LYSÁK et al., 1994).

As diferenças do conteúdo de DNA e do tamanho do genoma de algumas cultivares, também observadas, podem ser atribuídas ao efeito nucleotípico. Tal efeito atribui a tais variações importância tanto no desenvolvimento quanto na adaptação por meio de seus efeitos em parâmetros,

como volume nuclear e celular, tempo dos ciclos mitótico e meiótico (NUNES, 2008).

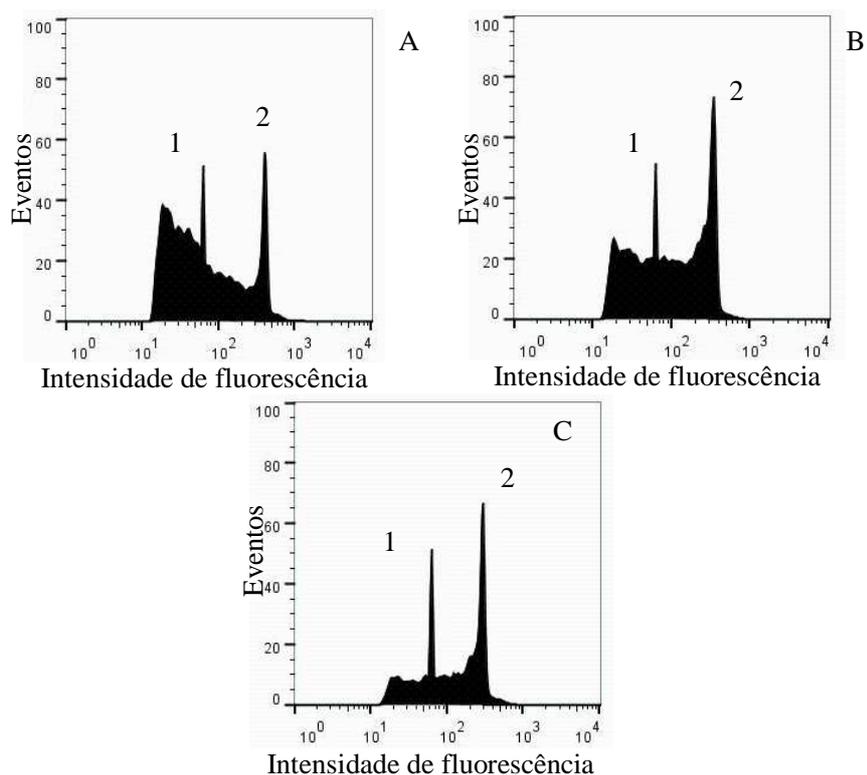


Figura 6 Histogramas de citometria de fluxo utilizados na quantificação do conteúdo de DNA de *Saccharum* spp. O primeiro pico corresponde a: A) cultivar CTC 7, B) cultivar CO 143, C) espécie *S. officinarum* L. e o segundo pico corresponde ao tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). UFLA, Lavras, MG, 2013

Para Williams et al. (2002), pode haver essa ligeira variação na quantidade de DNA porque há pequenas ampliações ou deleções de sequências de DNA nos cromossomos, durante o processo de hibridização.

Então, essa hibridação pode, eventualmente, alterar o tamanho do genoma, sem mudança simultânea no número de cromossomos.

Para o método de agrupamento ACoP, um gráfico bidimensional foi construído (Figura 7). Para isso, foram empregados os dois primeiros componentes fornecidos pela análise, pois explicaram 100,00% de variação entre as amostras, com 62,22% (F1) e 37,78% (F2), respectivamente. O agrupamento ACoP diferiu do método de Scott-Knot, classificando as cultivares em quatro grupos, porém, de forma diferente.

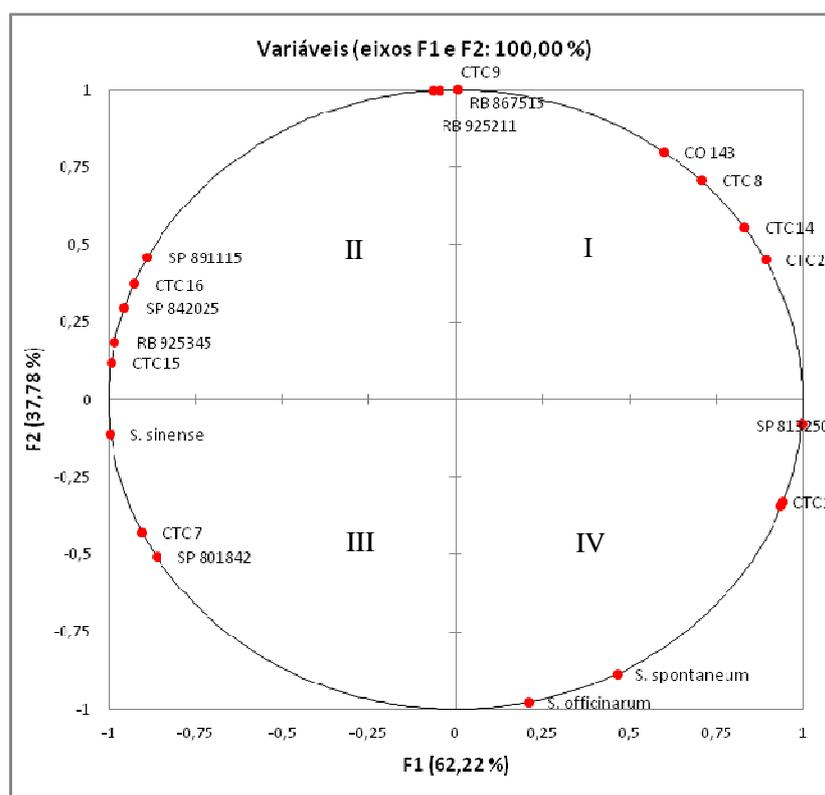


Figura 7 Análise de coordenadas principais (ACoP) para os 20 indivíduos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) analisados de acordo com o conteúdo de DNA (pg) e o tamanho genômico (Mpb). UFLA, Lavras, MG, 2013

Todos as cultivares analisadas estão bem representados neste plano (Figura 7), pois se encontram próximo da circunferência unitária. As variáveis que se encontram no mesmo quadrante são fortemente correlacionadas, o mesmo não ocorrendo com aquelas que estão em quadrantes opostos. Pelo método de ACoP, foi possível verificar aglomeração natural dos genótipos em razão da similaridade do conteúdo de DNA, demonstrando a eficiência da citometria de fluxo. O emprego de mais de um método de agrupamento permite que a classificação deles se complemente em função dos critérios que cada técnica utiliza e impede que inferências errôneas sejam adotadas na alocação de material dentro de determinado subgrupo de cultivares (ARRIEL et al., 2006; SILVA et al., 2012).

As cultivares agrupadas no quadrante I têm como principais características em comum a rusticidade, o alto teor de fibra e maior ocorrência de acamamento. Já as presentes no segundo quadrante são consideradas tardias. Aquelas localizadas no quadrante III têm produtividade elevada. Por fim, as localizadas no quarto e último quadrante são precoces e mais tolerantes a estresses (Figura 7) (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2013; HOFFMANN et al., 2008; MARIN, 2013).

4 CONCLUSÃO

É possível estabelecer uma análise confiável de citometria de fluxo em cana-de-açúcar utilizando o tampão de extração Marie, no mínimo 15 μ L de iodeto de propídeo e não se deve realizar a leitura das amostras imediatamente após a adição deste.

A citometria de fluxo classifica, segundo o conteúdo de DNA e o tamanho genômico, as cultivares e as espécies analisadas em quatro grupos.

REFERÊNCIAS

ADDINSOLFT. **XLSTAT for Windows, versão 2010**. Disponível em: <<http://www.xlstat.com/>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

ARRIEL, N. H. et al. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 801-809, maio 2006.

BARBOSA, M. H. P. et al. Estratégias de melhoramento genético da cana-de-açúcar em universidades. In: SIMPÓSIO SOBRE SELEÇÃO RECORRENTE, 9., 2005, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2005. 1 CD-ROM.

BARRE, P. et al. Reliable flow cytometric estimation of nuclear DNA content in coffee trees. **Cytometry**, New York, v. 24, n. 1, p. 32-38, Feb. 1996.

BENNET, M. D.; SMITH, J. B. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 274, p. 227-274, 1976.

BRITO, G. et al. Genetic characterisation of olive trees from madeira archipelago using flow cytometry and microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 55, n. 5, p. 657-664, Aug. 2008.

BROWN, J. W. The ribonuclease p database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 3660-3662, Feb. 1999.

BURNER, D. Chromosome transmission and meiotic behavior in various sugarcane crosses. **Journal American Society of Sugarcane Technologists**, Baton Rouge, v. 17, p. 38-50, Jan. 1997.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Variedades CTC**. Disponível em: <<http://www.ctcanavieira.com.br/downloads/variedades2013WEB3.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2013.

COSTICH, D. E. et al. Genome-size variation in switchgrass (*Panicum virgatum*): flow cytometry and cytology reveal rampant aneuploidy. **The Plant Genome**, Madison, v. 3, n. 3, p. 130-141, Nov. 2010.

DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 31, n. 1, p. 113-120, Feb. 1989.

DOLEZEL, J.; DOLEZELOVÁ, M.; NOVÁK, F. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, n. 3, p. 351-357, Sept. 1994.

DOLEZEL, J. et al. Nuclear DNA content and genome size in trout and human. **Cytometry A**, New York, v. 51, n. 2, p. 127-128, Feb. 2003.

DOLEZEL, J. et al. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, London, v. 82, n. 1, p. 27-35, 1998.

DOLEZEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 4, p. 625-631, Aug. 1992.

EDMÉ, S. J. et al. Determination of DNA content and genome size in sugarcane. **Journal American Society Sugarcane Technologists**, Baton Rouge, v. 25, p. 1-16, Jan. 2005.

GALBRAITH, D. W. et al. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. **Current Protocols in Cytometry**, Somerset, v. 7, n. 6, p. 7-22, 2001.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, New York, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GREILHUBER, J. et al. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. 99 p.

GUIMARÃES, N. C. C. et al. Identificação de variantes somaclonais em bananeiras 'Prata Anã', utilizando técnicas moleculares e citogenéticas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 448-454, mar./abr. 2009.

HOFFMANN, P. H. et al. **Variedades RB de cana-de-açúcar**. Araras: CCA/UFSCar, 2008. 30 p.

KOLANO, B. et al. Genome size variation in *Chenopodium quinoa* (Chenopodiaceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 298, n. 1, p. 251-255, Jan. 2012.

LEAL, F. et al. Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* variedades and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from another culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 9, p. 978-985, Sept. 2006.

LOUREIRO, J. et al. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 3, p. 679-689, June 2006a.

LOUREIRO, J. et al. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 3, p. 515-527, June 2006b.

LYSÁK, M. A.; DOLEŽEL, J. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). **Caryologia**, Firenze, v. 52, n. 1, p. 123-132, 1998.

LYSAK, M. A. et al. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 98, n. 8, p. 1344-1350, Sept. 1994.

MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2c values for seventy species. **Biology of the Cell**, London, v. 78, n. 1, p. 41-51, Mar. 1993.

MARIN, F. R. **Variedades**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2013. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html>. Acesso em: 10 ago. 2013.

NUNES, J. D. **Bandeamento cromossômico e conteúdo de DNA em espécies tropicais de Pinus**. 2008. 53 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

OCHATT, S. J. **Flow cytometry**: ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus. Disponível em: <<http://www.noble.org/medicagohandbook/index.html>>. Acesso em: 26 maio 2013.

PEDROZO, C. Â. **Eficiência da seleção em fases iniciais no melhoramento da cana-de-açúcar**. 2005. 109 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

PRICE, H. J.; HODNETT, G.; JOHNSTON, J. S. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. **Annals of Botany**, London, v. 86, n. 5, p. 929-934, Nov. 2000.

PRICE, H. J.; JOHNSTON, J. S. Influence of light on DNA content of *Helianthus annuus* Linnaeus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 93, n. 5, p. 11264-11267, Nov. 1996.

SCHMUTHS, H. et al. Genome size variation among accessions of *Arabidopsis thaliana*. **Annals of Botany**, London, v. 93, n. 3, p. 317-321, Jan. 2004.

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

SILVA, A. V. C. et al. Moringa genetic diversity from germplasm bank using RAPD markers. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Yucatan, v. 15, n. 1, p. 31-39, 2012.

WILLIAMS, B. R. et al. A murine model of Nijmegen breakage syndrome. **Current Biology**, London, v. 12, n. 8, p. 648-653, Apr. 2002.

ZHANG, J. et al. Genome size variation in three *Saccharum* species. **Euphytica**, Wageningen, v. 185, n. 3, p. 511-519, Mar. 2012.