



**FABÍOLA CARVALHO SANTOS**

**CITOGENÉTICA E ANATOMIA FOLIAR DE  
*BRACHIARIA RUZIZIENSIS* E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM O VALOR NUTRITIVO DA  
FORRAGEM**

**LAVRAS - MG**

**2011**

**FABÍOLA CARVALHO SANTOS**

**CITOGENÉTICA E ANATOMIA FOLIAR DE *BRACHIARIA*  
*RUZIZIENSIS* E SUA ASSOCIAÇÃO COM O VALOR NUTRITIVO DA  
FORRAGEM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Vânia Helena Techio

Coorientador

Dr. Fausto de Souza Sobrinho

**LAVRAS - MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Santos, Fabíola Carvalho.

Citogenética e anatomia foliar de *Brachiaria ruziziensis* e sua  
associação com o valor nutritivo da forragem / Fabíola Carvalho  
Santos. – Lavras : UFLA, 2011.

143 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Vânia Helena Techio.

Bibliografia.

1. Melhoramento genético. 2. Plasticidade morfológica. 3.  
Forrageira. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

**FABÍOLA CARVALHO SANTOS**

**CITOGENÉTICA E ANATOMIA FOLIAR DE *BRACHIARIA*  
*RUZIZIENSIS* E SUA ASSOCIAÇÃO COM O VALOR NUTRITIVO DA  
FORRAGEM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de abril de 2011.

Dr. Domingos Sávio Campos Paciullo                      Embrapa Gado de Leite

Dr. Fausto de Souza Sobrinho                              Embrapa Gado de Leite

Dra. Lisete Chamma Davide                                UFLA

Dra. Vânia Helena Techio

Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2011**

*Aos meus pais Dorval e Sonia e aos meus irmãos Ivo e Flávia com a graça de  
DEUS*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A DEUS.

Aos meus pais Dorval e Sonia, pelo amor ,afeto e pela pessoa que sou, agradeço todos os dias

Aos meus irmãos Ivo e Flavia, que sempre me apoiaram, agradeço pelo carinho.

A professora Vânia por cada dia que passa me surpreender com seu carisma de orientadora e sua competência, sempre me guiando para os melhores caminhos, sempre presente e aconselhando, agradeço pela paciência e ensino.

A professora Lisete sou eternamente grata pela confiança depositada para que eu seguisse a linha de citogeneticista, pelos ensinamentos, pela grande mãe durante todo esse tempo, carisma e conselhos.

A Laboratorista Iara agradeço pela ajuda, companhia durante toda execução do trabalho.

A toda equipe de laboratório sou muito grata pela ajuda, carinho, atenção e amizade criada em especial: Aline e Luis Felipe que me ajudaram perante a execução prática do projeto.

Ao Dr. Fausto de Souza Sobrinho pela confiança depositada, orientação, disponibilidade dos materiais, sempre eficiente na colaboração com o trabalho sou muito grata.

Ao Dr. Domingos Paciullo pelo tempo dedicado, sugestões e colaboração na banca.

Aos meus amigos do GEN por toda ajuda, amizade, companheirismo, atenção, conselhos sou grata e sentirei saudades. Em especial: Fernando Henrique Toledo, Guedes, Gui, Marcela, Gui, Jeremias, Thiago, Joyce, Bel, Lidi, Isabela e Flávia.

Ao professor Evaristo e Ze Airton agradeço pela colaboração no trabalho.

Aos funcionários do DBI por nos propiciarem um ambiente limpo e saudável além da atenção e carinho que recebemos todos os dias.

A FAPEMIG agradeço pelo financiamento do projeto.

Ao CNPq agradeço a bolsa de estudos.

A Embrapa Gado de Leite pelo fornecimento do material agradeço com carinho.

Deus concedei-me serenidade para aceitar as coisas que não posso modificar.

Coragem para modificar aquelas que posso.

E sabedoria para perceber a diferença.



## RESUMO

Recentemente as relações entre anatomia, digestibilidade e qualidade vem sendo amplamente estudadas para dar subsídio aos programas de melhoramento de espécies forrageiras na otimização de tempo e custos na seleção de genótipos, bem como no estudo da plasticidade morfológica. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar genótipos de *Brachiaria ruziziensis* cultivados na época das águas (outubro a março) e da seca (abril a setembro) em relação às características citogenéticas e anatômicas e correlacionar os dados anatômicos com a qualidade e digestibilidade. As análises citogenéticas e anatômicas foram realizadas por meio de técnicas convencionais. A determinação do conteúdo de DNA foi realizada por citometria de fluxo. Existem genótipos promissores para uso no programa de melhoramento, pois a variabilidade anatômica foi evidente entre eles, exceto para as características espessura das epidermes abaxial e adaxial. Também foi constatada a variação entre épocas para as demais características. Verificou-se que existem correlações entre os componentes químicos da parede celular com a digestibilidade. Entretanto, não foram observadas correlações significativas entre as características anatômicas com a digestibilidade. Por meio da determinação do conteúdo de DNA associado com a contagem de cromossomos foi possível discriminar genótipos de *B. ruziziensis*, *B. brizantha* e *B. decumbens*. *B. ruziziensis* apresentou fórmula cariotípica com 8 cromossomos metacêntricos e 1 submetacêntrico (8m+1sm) e cariótipo simétrico.

Palavras-chave: Plasticidade morfológica. Melhoramento genético. Forrageira. Citogenética.

## ABSTRACT

Recently the relationship between anatomy, digestibility and quality has been widely studied to give support to programs for improvement of forage species in optimizing time and costs in the selection of genotypes, and the study of morphological plasticity. Therefore, the aim was to evaluate genotypes of *Brachiaria ruziziensis* cultivated the dry (April to September) and rainy (October to March) in relation to cytogenetic and anatomical characteristics, and correlating the anatomical characteristics with the quality and digestibility. Cytogenetic analysis and anatomy were evaluated using conventional techniques. The determination of DNA content was analyzed by flow cytometry. There are promising genotypes for use in the breeding program, because the anatomical variability was evident between them except for the characteristics of thickness abaxial and adaxial epidermis. And found the variation between seasons for other traits. It was found that there are correlations between the chemical components of cell wall and digestibility. However, there were significant correlations between the anatomical traits with digestibility. By determining the DNA content associated with the counting of chromosomes was possible to discriminate genotypes of *B. ruziziensis*, *B. brizantha* and *B. decumbens*. *B. ruziziensis* presented karyotype with 8 metacentric chromosomes and a submetacentric (8m +1 sm) and symmetrical karyotype.

Keywords: Morphological plasticity. Breeding. Forage. Cytogenetics.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Importância e aspectos botânico-agronômicos de <i>Brachiaria</i></b> .....	14
<b>2.2</b>	<b>Melhoramento genético de <i>Brachiaria</i></b> .....	17
<b>2.3</b>	<b>Aspectos anatômicos e relação com a qualidade e digestibilidade da forrageira</b> .....	20
<b>2.4</b>	<b>Aspectos citogenéticos de espécies de <i>Brachiaria</i></b> .....	25
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	43
	<b>ARTIGO 1 Características anatômicas adaptativas de genótipos de <i>Brachiaria ruziziensis</i> em diferentes ambientes</b> .....	43
	<b>ARTIGO 2 inter-relações entre anatomia foliar e valor nutritivo de genótipos de <i>Brachiaria ruziziensis</i> na época das águas e da seca</b> .....	76
	<b>ARTIGO 3 Caracterização citogenética e quantificação de dna de <i>Brachiaria ruziziensis</i></b> .....	118

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A base para o crescimento da bovinocultura está no uso de forrageiras cuja relação de demanda por variedades novas e adaptadas é proporcional à intensificação da atividade pecuária. No Brasil, a maioria das gramíneas forrageiras de importância econômica é de origem africana, a exemplo de *Brachiaria*, *Panicum* e *Pennisetum*. Entre as nativas, apenas as espécies de *Paspalum* apresentam valor forrageiro. Essa situação tem requerido dos melhoristas esforços na implantação de programas de melhoramento genético de forrageiras tropicais, para obtenção e/ ou seleção de materiais superiores que possam aumentar a quantidade e qualidade da forragem produzida e a eficiência da produção animal.

As espécies de *Brachiaria* (Trin.) Griseb. apresentam potencial para atingir bons resultados, pois viabilizaram a atividade pecuária nos solos de baixa fertilidade e ácidos do Cerrado e contribuíram para o surgimento de novos pólos de desenvolvimento e colonização no Brasil Central (VALLE et al., 2008). Apesar disso, a quantidade de informações disponíveis sobre este grupo ainda é insuficiente para uso no melhoramento genético.

Nos países da América tropical, as fontes de variação para seleção de genótipos superiores provém de apenas cinco acessos de quatro espécies do gênero (*B. decumbens* Stapf., *B. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. *B. humidicola* (Rendle) Schweick. e *B. dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf.) que geraram as 20 cultivares disponíveis (KELLER-GREIN et al., 1996). Estas espécies apresentam predominantemente poliploidia ( $2n=4x=36$ ) associada com modo de reprodução apomítico. *B. ruziziensis* R. Germ. & C. M. Evrard, por sua vez, apresenta reprodução sexual e diploidia ( $2n=2x=18$ , genoma R)

podendo ser uma alternativa para a realização de cruzamentos e ampliação da variabilidade dentro do gênero.

Embora não seja a espécie com maior área cultivada, a demanda por sementes de *B. ruziziensis* tem aumentado, acompanhando o incremento da integração entre agricultura, pecuária e floresta. Além disso, em relação às demais espécies do gênero, apresenta melhor adaptação a sobressemeadura e menor uso de herbicida na dessecação para estabelecer a cultura seguinte. Outra vantagem é que a produção de sementes é uniforme, pois floresce uma vez ao ano, o que torna o seu controle mais fácil. Entretanto, o pequeno número de cultivares disponíveis no mercado e a carência de informações referentes ao seu potencial forrageiro dificultam a expansão da área cultivada com a espécie (SOUZA SOBRINHO, 2005a), justificando a realização do melhoramento genético.

Como parte inerente do programa de melhoramento genético, a avaliação sistemática dos genótipos deve ser feita em diferentes etapas visando identificar os melhores materiais. Neste processo, a citogenética é indispensável para discriminação de genótipos, certificação de ploidias, determinação do número cromossômico e de similaridades cariotípicas e, ainda, para verificação de anormalidades cromossômicas e indicação dos níveis de fertilidade. Estas informações subsidiam as decisões dos melhoristas e contribuem para reduzir o tempo na escolha dos genótipos mais estáveis e compatíveis.

Considerando a existência de diferentes níveis de ploidia em *Brachiaria*, a contagem do número de cromossomos associada à quantificação do DNA via citometria de fluxo constitui uma estratégia de segurança para o melhorista no período que precede a realização dos cruzamentos, especialmente quando se dispõe de uma grande quantidade de genótipos para avaliar e selecionar.

Outra contribuição ao programa de melhoramento da *Brachiaria* pode ser dada por estudos de anatomia foliar. A proporção de tecidos tem sido a

característica anatômica usada como indicativo indireto do valor qualitativo, da produtividade e da digestibilidade das forrageiras. A possibilidade de se associar estas características surgiu com a observação de que diferentes tipos de tecidos apresentam taxa e extensão de digestão diferenciadas (AKIN; BURDICK, 1975). Tecidos com elevado conteúdo celular e/ ou delgada parede primária (não lignificada) apresentam alta digestibilidade e tecidos com baixo conteúdo celular e espessa parede celular (freqüentemente lignificada) são normalmente associados à baixa digestibilidade. As medidas da proporção desses tecidos, relacionados com as áreas, podem ser usadas para explicar diferenças qualitativas entre espécies e/ ou cultivares de forrageiras (WILSON, 1997).

O objetivo do trabalho é caracterizar genótipos de *Brachiaria ruziziensis* quanto às características citogenéticas, anatômicas e bromatológicas e verificar a associação entre essas duas últimas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância e aspectos botânico-agronômicos de *Brachiaria*

No Brasil, 90% da carne é produzida em sistemas cuja alimentação do rebanho está baseada exclusivamente em pastagens, com destaque para as gramíneas do gênero *Brachiaria* e *Panicum* que apresentam maior valor agregado ao comércio de suas sementes e maior área cultivada (FERNANDES et al., 2000). Aproximadamente 85% das sementes comercializadas anualmente no Brasil Central para implantação, recuperação ou renovação de pastagens utilizam o gênero *Brachiaria*, visto que estas pastagens cultivadas são mais importantes e, às vezes, a única fonte de alimentação dos bovinos de corte.

Essas gramíneas ocupam uma posição de destaque na pecuária nacional, pois se adaptaram bem a solos ácidos e com baixa fertilidade. Além disso, a fácil multiplicação por sementes, associada à agressividade na competição com invasoras, explicam a rápida expansão das braquiárias (VALLE et al., 2008).

O gênero *Brachiaria* pertence à tribo Paniceae e compreende cerca de 100 espécies, distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais, mas com grande concentração no continente africano, em habitats variados, desde várzeas inundáveis até savanas (VALLE et al., 2008). No Brasil, foram introduzidas a partir de 1950 e se expandiram, principalmente nas regiões de clima mais quente, nas décadas de 1970 e 1980 (ZIMMER et al., 1988). Atualmente, encontram-se 15 espécies deste gênero, sendo sete de introdução recente: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola*, *B. arrecta*, *B. ruziziensis* e *B. vittata*. (SOARES FILHO, 1996).

*B. decumbens* é perene e se adapta bem ao clima moderadamente úmido, em pastagens abertas ou em áreas com arbustos esporádicos e em solos férteis

(BOGDAN, 1977). No Brasil há dois cultivares de *Brachiaria decumbens*. O primeiro conhecido como cultivar IPEAN, introduzido pelo Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte em Belém – PA em 1952, cultivar que apresenta crescimento mais decumbente, com raízes nos nós e folhas muito pilosas. O segundo é proveniente da Austrália, porém de origem Africana e teve seu desenvolvimento inicial no Estado de São Paulo, sendo um cultivar mais robusto, de crescimento sub-erecto e com folhas menos pilosas, sendo conhecido como cultivar Basilisk ou cultivar Australiana (ALCANTARA, 1987). *B. brizantha* difere de *B. decumbens* e *B. ruziziensis* em relação ao porte que é quase ereto, pouco enraizamento nos nós, folhas pilosas em forma de canoa e ráceros geralmente mais longos. *B. humidicola* apresenta alta capacidade de adaptação a vários tipos de solos, especialmente, os de baixa fertilidade, com alto nível de umidade e ácidos; tolera secas prolongadas e apresenta folhas de cor verde-pálida e fortemente denticuladas nas margens, resistência ao pastejo e à cigarrinha (SOARES FILHO, 1996).

*B. ruziziensis* está mais proximamente relacionada com *B. decumbens*, da qual difere, no entanto por ser de porte maior e apresentar a gluma inferior distante do resto da espiguetta (SOARES FILHO, 1996). É uma espécie perene, sub-ereta, com 1-1,5 m de altura e apresenta a base decumbente e radicante nos nós inferiores. Possui rizomas fortes, em forma de tubérculos arredondados e com até 15 mm de diâmetro. As folhas são lineares e lanceoladas, de cor verde amareladas (SEIFFERT, 1980). A inflorescência é formada por 3-6 racemos de 4-10 cm de comprimento. Ráquis largamente alada, com 4 mm de largura, geralmente de cor arroxeada. Espiguetas de 5 mm de comprimento, pilosas na parte apical, bisseriadas ao longo da ráquis. A gluma inferior tem 3 mm de comprimento e surge 0,5 a 1 mm abaixo do resto da espiguetta e o flósculo fértil apresenta 4 mm de comprimento (SENDULSKY, 1977). A propagação de *B. ruziziensis* se dá por meio de sementes ou vegetativamente.



Existem atributos exclusivos e vantajosos de *B. ruziziensis* em relação às demais espécies de *Brachiaria*, tais como a diploidia e o modo de reprodução sexual que permitem a realização de cruzamentos e geração de variabilidade para seleção de materiais com características agronômicas superiores. Entretanto, o pequeno número de cultivares disponíveis no mercado e a ausência de informações mais detalhadas referentes ao seu potencial forrageiro dificultam a expansão da área cultivada com essa espécie. Essa situação constitui um fato motivador para a implementação de um programa de melhoramento visando a obtenção de novas cultivares capazes de atender a demanda da pecuária brasileira.

No que diz respeito à qualidade da forragem, Souza Sobrinho et al. (2005b) avaliando diferentes cultivares de *Brachiaria* observaram que a cultivar comum de *B. ruziziensis* foi a única incluída em agrupamento superior para todas as características em todas as partes da planta avaliadas. Essa cultivar apresentou 63,48%, 52,43% e 57,82% de digestibilidade das folhas, do caule e da planta toda, respectivamente, e maior valor absoluto de proteína bruta (9,47%) e os menores de fibra (FDN e FDA). A superioridade da *B. ruziziensis* para características bromatológicas de forragem foi constatada também por Hughes et al. (2000). Valle et al. (1988) resumiram estudos de 36 acessos de *Brachiaria* e observaram que a *B. ruziziensis* se destacou na qualidade, pois apresentou os menores teores de FDN, FDA, celulose e hemicelulose e cinzas que as demais espécies. A *Brachiaria ruziziensis* possui alta palatabilidade, alta produtividade de massa, tem potencial produtivo de até 15t MS/ha/ano apresenta boa tolerância ao sombreamento e baixadas úmidas (ARAUCÁRIA SEMENTES, 2010)

## 2.2 Melhoramento genético de *Brachiaria*

A atenção ao melhoramento de forrageiras é uma atividade recente no Brasil e que requer equipes multidisciplinares envolvidas no desenvolvimento de cultivares de melhor qualidade, mais produtivas e adaptadas às condições ambientais encontradas em diferentes regiões do país. Há uma carência de pesquisadores atuando na melhoria de forrageiras tropicais, apresentando uma limitação de conhecimentos básicos e dificultando a obtenção de resultados para o melhoramento genético.

Assim como para outras espécies, os programas de melhoramento de forrageiras também utilizam a hibridação como melhor opção para gerar variabilidade e novas cultivares. Poucas são as cultivares obtidas pelo programa de melhoramento, pois a maioria provem de seleções coletadas no país ou introduzidas e outras de trabalhos de seleção em grandes coleções representativas da variabilidade. O CIAT fez coletas na África e montou um banco de germoplasma representativo do gênero *Brachiaria*. Acessos foram cedidos para Embrapa Gado de Corte uma das responsáveis pelo programa de melhoramento do gênero. A Embrapa Gado de Leite conduz um o programa de melhoramento de *Brachiaria ruziziensis* e realizou coletas de recursos genéticos explorando a variabilidade natural no Brasil com objetivo de gerar novas variedades por meio de cruzamentos.

Os programas de melhoramento de forrageiras possuem objetivos semelhantes aos das grandes culturas, quais sejam, o aumento da produtividade e da qualidade, a resistência a pragas e doenças, a produção de sementes de boa qualidade, o uso eficiente de fertilizantes e a adaptação à estresses edáficos e climáticos (VALLE et al., 2008). Porém, constitui um desafio a um conjunto de problemas diferentes daqueles encontrados para as culturas anuais, devido a existência da complexa relação solo-planta-animal. Assim, o objetivo do

melhoramento não se resume em somente obter uma planta mais produtiva, mas em conseguir maior eficiência na produção animal (SOUZA SOBRINHO, 2005c).

Entre as forrageiras, o gênero *Brachiaria* embora de introdução mais recente nas Américas, tem se destacado nos últimos 30 anos por apresentar boa qualidade forrageira. Alguns autores relatam objetivos específicos deste gênero nos programas como a resistência a cigarrinha, aumento do valor nutritivo, adaptação a solos ácidos, produção de sementes e resistência a *Rhizoctonia* (MILES; VALLE, 1996; MILLES, 1999; PETERS ;LASCANO, 2003; VALLE, 2001).

Dentre as espécies de *Brachiaria*, somente cinco acessos de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. humidicola* deram origem aos 20 cultivares liberados em diversos países da América tropical, entre eles: Brasil, Cuba, México, Venezuela, Costa Rica, Colômbia, Panamá e Equador. Poucos acessos ligados somente a três espécies (*B. brizantha*, *B. humidicola* e *B. decumbens*) deram origem as cultivares comerciais, revelando que há uma estreita base genética dos materiais cultivados de *Brachiaria*. Outro fator considerável pelo estreitamento da base genética é o pequeno número de cultivares hoje disponíveis para a formação de pastagens em relação à extensão territorial e a diversidade edafoclimática do Brasil. Portanto, há necessidade de programas de melhoramento para gerar variabilidade e desenvolver cultivares mais promissoras para essas condições (KELLER-GREIN et al., 1996).

A uniformidade genética existente pode ser explicada pelo modo de reprodução desse gênero e pelas barreiras impostas em cruzamentos devido à poliploidia. O mecanismo principal de reprodução é também fator determinante dos métodos de melhoramento mais indicados para cada uma das espécies estudadas (PEREIRA et al., 2001). Todas as cultivares registradas são apomíticas, exceto a única de *B. ruziziensis*.

A apomixia em *Brachiaria* é apospórica do tipo *Panicum* e geralmente facultativa, isto é, algumas flores exibem ocasionalmente sacos meióticos passíveis de serem fecundados e originarem híbridos permitindo gerar variabilidade e formar novos genótipos promissores que podem ser selecionados. Portanto, o modo de reprodução apomítico dificulta os cruzamentos, impedindo a variabilidade e aumentando os riscos para os agricultores devido à vulnerabilidade a doenças.

Não existem recomendações específicas de métodos de melhoramento para plantas poliplóides e apomíticas como a *Brachiaria*, mas tanto o CIAT na Colômbia quanto a Embrapa Gado de Corte em Campo Grande-MS, tem utilizado a seleção recorrente em populações geradas por cruzamentos de indivíduos superiores sexuais x apomíticos envolvendo três espécies com destaque nas características agronômicas: *B. ruzizensis*, como fonte de sexualidade; *B. brizantha* e *B. decumbens*, como doadoras de pólen (VALLE et al., 2008).

*B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruzizensis* são empregadas em programas de melhoramento genético, pois devido à proximidade genética possibilitam a formação de híbridos interespecíficos superando as barreiras da ploidia. Cruzamentos entre *B. brizantha/B. decumbens* com *B. ruzizensis* sexual, tetraploidizada artificialmente viabilizaram produção de híbridos para avaliação do desempenho agronômico, ao mesmo tempo foi estudada a herança da apomixia que demonstrou ser simples e dominante sobre a sexualidade (SAVIDAN; VALLE, 1999).

Existe ainda a limitação pela diferença de ploidia entre os genitores sexuais (diplóides) e os apomíticos (tetraplóides). Para contornar esse problema pode-se recorrer à haploidização ou à duplicação cromossômica.

A identificação de variabilidade genética para as principais características forrageiras dentro de *B. ruziziensis* possibilita a realização de seleção e obtenção de novas cultivares com ganhos significativos.

Além da diploidia e do modo de reprodução sexual, *B. ruziziensis* é uma espécie perene e promissora para o melhoramento genético, pois apresenta alguns atributos positivos como: elevada qualidade de forragem e valor alimentício, boa produção de sementes, facilidade de estabelecimento, resposta à adubação, alta palatabilidade e aceitação por bovinos. As características desfavoráveis que os programas de melhoramento tentam contornar se resumem a menor adaptação a solos ácidos, úmidos e de baixa fertilidade, susceptibilidade à cigarrinha das pastagens, crescimento reduzido durante os períodos de seca e baixa competição com invasoras.

O sucesso de um programa de melhoramento de *B. ruziziensis* poderá representar impactos altamente favoráveis para a pecuária brasileira. Em um país onde a grande maioria do rebanho é criada a pasto, o desenvolvimento de cultivares de forrageiras com ampla adaptação e pouco exigentes em fertilidade é importante para expansão da área cultivada e conseqüentemente para o aumento do rebanho bovino. Além disso, a *B. ruziziensis* é reconhecida dentro do gênero como de qualidade superior da forragem e melhor palatibilidade em relação às demais espécies, ou seja, elevados teores de proteína bruta e digestibilidade e baixo teor de fibras (SOUZA SOBRINHO et al., 2005b).

### **2.3 Aspectos anatômicos e relação com a qualidade e digestibilidade da forrageira**

O valor qualitativo das forrageiras é de grande importância no subsídio aos programas de melhoramento que desejam obter um resultado relevante no complexo solo-planta-animal com base na adequada alimentação animal. O

valor nutritivo é definido pela sua degradabilidade ruminal, digestibilidade e composição química (POSSENTI;VALARINI, 2003) e pode ser prejudicado pela presença de algumas estruturas e compostos químicos presentes nas forragens.

A estrutura anatômica dos órgãos da planta pode influenciar na digestibilidade dependendo da constituição de seus tecidos. A proporção de tecidos influencia na acessibilidade e o modo de ação dos microorganismos aos polissacarídeos resultantes da fragmentação das partículas da forrageira, estes tem a capacidade de digerir a celulose e não a lignina. Segundo Brito e Rodella (2001), as características anatômicas da planta podem fornecer uma série de indicações antecipadas sobre o seu potencial de digestibilidade e serem utilizadas como uma primeira aproximação para a caracterização da qualidade das forragens.

Estudos multidisciplinares tem sido importantes na determinação do valor nutritivo principalmente quando interligados com a caracterização anatômica. Nas últimas décadas vários autores tem relatado essa associação da anatomia com qualidade de forrageira (ALVES DE BRITO, 1997;1999; PACIULLO 2001; 2002). Diversos pesquisadores também tem avaliado a influência da estrutura anatômica e composição química na digestibilidade (AKIN et al., 1973, AKIN; BURDICK, 1975; CHESSON et al., 1986; HANNA et al., 1973, JUNG;ALLEN 1995; JUNG et al., 1997; QUEIROZ et al.,2000 TWIDWELL et al., 1991;WILSON et al., 1991). Sendo que no Brasil esses estudos são mais recentes (BRITO et al., 1997, LEMPP et al., 1997, 1998, PACIULLO, 2000).

Alves de Brito et al. (1999) descreveram os tecidos em ordem decrescente de digestibilidade: parenquimático, floema, epiderme, bainha parenquimática, xilema e esclerênquima e com a utilização da microscopia de varredura concluiu que tecidos lignificados são limitados na digestão. O similar

foi observado por Hanna (1973) e Akin (1989), o quais afirmaram que tecidos lignificados são resistentes à digestão.

Vários autores também enfatizam a complexidade do estudo da digestão em plantas forrageiras envolvendo vários fatores como idade, posição do perfilho, tipo de tecido, temperatura entre outros. Akin (1989) afirmou que a digestibilidade do parênquima decresce a medida que a forrageira se desenvolve. Segundo Paciullo (2000), a digestibilidade reduz com aumento da idade, enfatizando que o estágio de desenvolvimento é um dos fatores mais relevantes na influência do valor nutritivo. Além disso, existe a influência da estação do ano, em que os valores altos de digestibilidade são encontrados mais nas estações frias do que nas quentes (MACADAM et al., 1996). De acordo com Wilson (1982) em revisão dos efeitos de fatores climáticos sobre o valor nutritivo de espécies forrageiras, a temperatura é o fator mais importante, sendo que a digestibilidade diminui de 0,08 a 1,81 unidades percentuais para cada grau centígrado de elevação da temperatura. Também existem trabalhos contradizendo os anteriores que não apresentaram diferença na estrutura dos tecidos quanto ao clima levando em conta temperatura, fotoperíodo ou estação de ano (AKIN et al., 1987; QUEIROZ, 1997).

Outro fator que compromete a digestibilidade é a composição química da parede celular composta principalmente de celulose, hemicelulose, pectina e lignina compreendendo entre 20-80% do peso seco da forragem. Estudos tem encontrado correlações baixas da lignina com a digestibilidade da parede celular (HALIM et al., 1989, JUNG; CASLER, 1991; JUNG; VOGEL, 1992) ou até positivas (JUNG et al., 1994). Jung e Allen (1995) relatam que a composição da lignina pode diferir entre espécies, cultivares, frações da planta e tecidos, o que modifica o impacto da lignificação sobre a digestibilidade explicando essas diferenças nas relações.

A composição química da parede celular, principalmente a lignina, são fatores JUNG; ALLEN, 1995;). Dependendo da composição da lignina, ou do tipo de lignina “core” ou “non core”, pode apresentar altas correlações negativas com a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) (QUEIROZ et al., 2000; JUNG et al., 1997; PACIULLO, 2001), ou até correlações positivas (JUNG et al., 1994). Jung et al. (1997) em gramíneas forrageiras observaram forte correlação negativa entre teores de lignina e DIVMS. A deposição de lignina aumenta com a maturação fisiológica e fatores ambientais como altas temperaturas, diminuindo assim a digestibilidade dos polissacarídeos estruturais pelos ruminantes (JUNG; VOGEL, 1986; KAMSTRA et al., 1958; TERRY; TILLEY, 1964).

Tecidos lignificados com parede secundária espessa são pouco digeríveis, apresentando correlação negativa com a digestibilidade, como o esclerênquima e o xilema, contribuindo para baixa qualidade da forrageira. Já tecidos como mesofilo e floema apresentam positiva com a digestibilidade devido a facilidade de atuação ou colonização dos microorganismos nestes tecidos no rumem do animal e por não apresentarem parede celular espessa, ou lignificada, sendo portanto digeridos rapidamente. Além disso, existem tecidos com digestão parcial e lenta como as células da epiderme e bainha parenquimática dos feixes, (AKIN et al., 1973; 1989; BRITO et al., 1999). Os constituintes fibrosos (fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido ) também tem sido correlacionados negativamente com a digestibilidade (QUEIROZ et al., 2000; WILSON et al., 1983;). Correlação dos teores de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido com a digestibilidade, parece estar condicionada ao grau de associação entre os teores de lignina e de fibra. Se esta associação é baixa, o conteúdo de fibra da forrageira não será bom indicador da digestibilidade (VAN SOEST, 1994; QUEIROZ et al., 2000). Os teores de fibra em detergente ácido são, freqüentemente, utilizados para estimativas da



digestibilidade. Os coeficientes de correlação entre as concentrações de fibra em detergente ácido e a digestibilidade da matéria seca variam entre -0,5 e -0,95 (MINSON, 1982).

O valor nutritivo das gramíneas que se desenvolvem em condições de clima tropical é limitado, não somente pela incidência das elevadas temperaturas, que promovem mais intensa lignificação da parede celular, mas também por características histológicas e anatômicas inerentes à estas gramíneas.

Alguns autores acreditam ser relevante a integração de conhecimentos morfológicos e anatômicos da planta com bioquímicos e fatores ambientais (ASHTON; BERLYN 1992; PACIULLO et al.,2002).

De acordo com Sylvester et al. (2001) a estrutura anatômica das plantas, em especial, das folhas pode ser influenciada pela luminosidade durante seu crescimento, uma mecanismo denominado de plasticidade morfológica detectada na interação genótipo com ambiente.

A interação genótipo x ambiente corresponde à resposta diferencial dos genótipos às mudanças dos ambientes (BOS ; GALIGARI, 1997), evidenciando assim, a dependência entre os efeitos genéticos e ambientais. Visto que o principal objetivo de um programa de melhoramento é selecionar genótipos de consistência e elevada produtividade nos mais diversos ambientes, a análise da interação genótipo com ambiente é de grande importância.

Alguns autores discutem a influência da luz e temperatura na anatomia foliar, principalmente no desenvolvimento do órgão. Especificamente em *Brachiaria* existem estudos da anatomia do colmo e da folha na alternância do período seco e chuvoso, (PACIULLO, 2002).

Estudos recentes avaliando a influência da estrutura anatômica sobre a qualidade de gramíneas forrageiras ainda são escassos, tendo em vista o

potencial de desenvolvimento desta área. A necessidade de se estabelecer um banco de informações à respeito da anatomia das diferentes gramíneas forrageiras, incluindo a proporção de tecidos, os fatores que determinam a digestão da parede celular e, conseqüentemente, dos diferentes tecidos, a influência da estrutura anatômica sobre o consumo pelo animal, entre outros, torna-se evidente para permitir avanços no conhecimento das relações entre os fatores anatômicos e a qualidade das gramíneas forrageiras.

O estudo anatômico de lâminas foliares de gramíneas forrageiras tem auxiliado na compreensão das diferenças qualitativas entre essas plantas, que algumas vezes não são detectáveis em análises químicas (LEMPP et al., 2002), sendo possível classificar os tipos de fatores de antiqualidade por meio da anatomia e da histoquímica vegetal. Além disso, normalmente essas análises são mais rápidas e de menor custo, quando comparadas às análises das características bromatológicas da forragem. Esse fato permite a avaliação de maior número de materiais em um período mais curto de tempo, com redução de custos, contribuindo para maior agilidade do programa de melhoramento.

#### **2.4 Aspectos citogenéticos de espécies de *Brachiaria***

Os primeiros estudos de citogenética com espécies do gênero *Brachiaria* reportam-se à metade do século passado. Como resultado, informações básicas importantes relacionadas à determinação do número cromossômico, à construção dos cariótipos, mapeamento físico e ao comportamento meiótico foram apresentadas por diferentes autores, constituindo uma base de dados, ainda insuficiente, sobre a estrutura genética e citogenética do gênero.

Na década de 80, o conhecimento citogenético do gênero *Brachiaria* se restringia a apenas 35% das espécies, e abrangia somente contagens cromossômicas (BASAPPA et al., 1987). Alguns estudos envolvendo contagens

cromossômicas (BERNINI, 1997) e determinação do nível de ploidia por citometria de fluxo, Ishigaki 2010; Leteriello, 1999; Penteado et al., 2000, foram, posteriormente, desenvolvidos.

O número básico de cromossomos relatado para o gênero é  $x = 7, 8$  e  $9$ , com predominância de  $x=9$  (BASAPPA et al., 1987; DARLINGTON; WYLIE, 1955; DUJARDIN 1979; MORRONE; ZULOAGA, 1992; VALLE; SAVIDAN, 1996). Todavia, recentemente Risso-Pascotto et al. (2006) relataram a ocorrência de  $x = 6$  para acessos de *B. dictyoneura*, os quais apresentaram  $2n = 24$ , e *B. humidicola*, com  $2n=42$ . Boldrini et al. (2009) observaram na meiose presença de seis univalentes em *B. humidicola* propondo também o número básico  $x=6$  cromossomos. O grande número de anormalidades meióticas em espécies de *Brachiaria* dificulta estudos como estes.

A maioria das espécies do gênero *Brachiaria* é poliploide, preferencialmente tetraploide ( $2n=4x=36$ ) e apomítica (BASAPPA et al., 1987; BERNINI; MARIN-MORALES 2001, MENDES BONATO et al., 2002, 2006; PENTEADO et al., 2000; RISSO-PASCOTTO et al., 2006; SOTO-MAYOR-RÍOS et al., 1968; UTSUNOMIYA et al. 2005, VALLE; SAVIDAN, 1996). Em *B. ruziziensis*, um estudo feito com 36 acessos por Valle e Savidan (1996) não encontrou saco embrionário apomítico, confirmando ser uma espécie diploide sexual, utilizada como base nas hibridações interespecíficas quando tetraploidizada artificialmente.

Em 1987, Basappa e colaboradores publicaram resultados da contagem de cromossomos de espécies de *Brachiaria* realizada em 260 populações representativas de diferentes regiões geográficas do mundo. Foram descritas seis espécies diploides, vinte tetraploides, cinco hexaploides e três octaploides entre os materiais avaliados. Exceto para *B. setigera* var. *setigera* a qual foi caracterizada como um complexo agâmico com uma série heteroplóide, para as demais espécies não foram distinguidas raças cromossômicas.

Posteriormente, em um estudo realizado no Brasil, Bernini e Marin-Morales (2001) caracterizaram o cariótipo de 12 acessos e cinco espécies de *Brachiaria*. Os autores relataram variações no número cromossômico em *B. decumbens* ( $2n=18$  e  $36$ ) e em *B. humidicola* ( $2n=36$ ,  $42$  e  $54$ ). *B. jubata* e *B. brizantha* apresentaram  $2n=36$  e *B. ruziziensis*,  $2n=18$ . Nestas análises, com exceção de um acesso de *B. humidicola* ( $x=7$ ), os demais apresentaram número básico de cromossomos igual a 9. Os cariótipos foram classificados como simétricos com tendência à assimetria em direção aos poliplóides. Foi sugerido também que alterações estruturais como deleções e adições e, principalmente, poliploidia estão envolvidas na evolução desse gênero.

A associação das informações das análises morfológicas, citológicas e moleculares possibilita estabelecer as relações de parentesco e observar muitas características intermediárias entre *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* (TOHME et al., 1996). Basappa et al. (1987) descreveram que as irregularidades meióticas ocorrentes em *B. decumbens*, assemelham-se às encontradas em *B. ruziziensis* ( $n=9$ ) e *B. brizantha* var. *brizantha* ( $n=27$ ), indicando que a espécie é um híbrido natural desta última. A proximidade entre essas espécies permite a obtenção de híbridos, tais como descrito por Hacker (1988) entre *B. ruziziensis* tetraploidizada e *B. decumbens* e *B. brizantha*, constituindo uma excelente alternativa para ampliação da base genética do gênero e para aplicações no melhoramento genético.

Comparações entre as características morfológicas e moleculares da literatura e os dados cariotípicos propostos por Bernini e Marin-Morales (2001) sugerem que a diferenciação cromossômica observada nos acessos de *Brachiaria* não foi acompanhada por grandes mudanças morfológicas. As espécies *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* mesmo apresentando caracteres morfológicos similares e capacidade de cruzamento, têm características cariotípicas distintas, o que fornece uma informação adicional

para o estabelecimento das relações de parentesco entre as espécies de *Brachiaria*. No mesmo trabalho foi observado que a diferença no número básico e cariotípica indicou presença de diferentes genomas ou rearranjos dos cromossomos nos acessos das espécies.

Stephan Nielen et al. (2010) estudou a morfologia dos cromossomos e foi o primeiro a utilizar a hibridização *in situ* (FISH) com genes ribossomais 5S e 45S para localização de sítios de DNA ribossomal em acessos diploide sexual e um tetraploide apomítico de *Brachiaria brizantha*. O autor encontrou resultados de similaridades morfológicas entre os acessos tetraplóides descritos por Bernini e Marin Morales (2001) em relação a posição do centrômero, embora no tamanho dos cromossomos tenham sido maiores. Os resultados morfológicos discutidos e comparados dos dois autores sugerem possíveis alterações estruturais durante a evolução, além de uma distância filogenética entre os acessos analisados por eles.

Estudos recentes tentaram elucidar a hipótese do tipo de ploidia no gênero *Brachiaria*. Mendes-Bonato (2002), relatou ser uma aloploidia segmental através da análise do comportamento meiótico com uma frequência baixa de multivalentes. Já Stephan Nielen et al. (2010) utilizando a técnica do FISH sugeriu a aloploidia pelo número de marcas encontradas do DNAr 5s, em acessos diploide e tetraploide de *Brachiaria brizantha*, um e três pares respectivamente. Outros autores corroboram com essa hipótese da aloploidia (BOLDRINI et al., 2009; MENDES-BONATO et al., 2002, MENDES et al., 2006; RISSO PASCOTTO et al., 2006)

Trabalhos realizados por Ito et al (2000) e Akiyama et al, (2008) pesquisando sequências altamente repetitivas no genoma utilizando o FISH com 5S e 45S de DNA ribossomal em *Brachiaria* encontraram marcas localizadas em cromossomos específicos podendo distingui-los Akiyama et al., 2010 encontrou numero de marcas do 25S rDNA correspondendo ao nível de ploidia, além disso

a morfologia dos cromossomos foi diferente dentro e entre espécies. Indicou também presença de diferentes genomas nas espécies.

Na descrição do cariótipo feita por Bernini e Marin-Morales (2001), o acesso diplóide R134 de *B. ruziziensis* ( $2n=18$ ) apresentou dois pares de cromossomos metacêntricos *stricto sensu* e os outros sete pares metacêntricos, com presença de satélite no par de cromossomos 8. Stephan Nielen et al. (2010) encontrou o satélite no mesmo par de cromossomos no acesso analisado de um diplóide sexual de *Brachiaria brizantha* sugerindo então possíveis alterações estruturais durante a evolução desses acessos. Anteriormente, Valle et al. (1987) havia identificado os nove cromossomos por meio de mapas paquitênicos e observando a distribuição e tamanho dos cromômeros e medições cromossômicas. Esses dados mostraram que a maioria dos cromossomos eram submetacêntricos, com a região organizadora do nucléolo (RON) no par 7. Bernini e Marin-Morales (2001) descreveram a existência de similaridades entre esse acesso de *B. ruziziensis* e o diplóide D5 de *B. decumbens* ( $2n=18$ ) para o comprimento do lote haplóide e para a morfologia cromossômica.

Especificamente para *B. ruziziensis*, os relatos na literatura sobre os cromossomos mitóticos e o comportamento meiótico são restritos. Shank and Sotomayor-Rios estudaram (1968) eventos citológicos da megasporogênese em uma população de *B. ruziziensis* relatando número cromossômico somático igual a 18. Ferguson (1974) confirmou  $n=9$  em 22 plantas de 16 acessos, com meiose regular apresentando 9 bivalentes formados na diacinese. Não foram encontrados relatos de saco embrionário apomítico nessa espécie em ambos trabalhos.

A citometria de fluxo vem sendo amplamente utilizada na quantificação de DNA nuclear em plantas, ( BENNETT et al., 2000; SCHIFINO-WITTMANN, 2001), Essa técnica vem sendo utilizada em diversos grupos de gramíneas, tais como , 1997), *Pennisetum* (MARTEL et al., 1997), *Crepis*

(DIMITROVA; GREILHUBER, 2000) e *Brachiaria* (PENTEADO et al., 2000; TIMBÓ, 2010) entre muitos outros.

Para a grande maioria, a técnica tem tido sucesso por permitir avaliar grande número de indivíduos, com precisão e rapidez além de apresentar pouca variação dos resultados obtidos em diferentes laboratórios (LYSÁK; DOLEŽEL, 1998).

Essa técnica pode ser útil no melhoramento de plantas para monitorar a estabilidade do nível de ploidia, identificar haploides e duplohaploides em culturas de anteras e ovários, verificar novos níveis de ploidia em resultados de cruzamentos, detecção de indivíduos aneuploides, no estudo da apomixia, identificação do sexo em plantas dióicas, identificação de híbridos, identificação de polissomatia, acompanhamento do desenvolvimento da semente, identificação do produto de fusão de protoplastos, Dolezel (1997) .

Estudos de citometria de fluxo em espécies de *Brachiaria* também vêm sendo realizados com o intuito de quantificar o DNA e determinar o nível de ploidia de diferentes genótipos. Letteriello et al. (1999) associaram resultados de contagens de cromossomos e de determinação do teor de DNA para certificação da ploidia em acessos de *Brachiaria brizantha* e mencionaram, pela primeira vez, a ocorrência de acessos pentaplóides,  $2n=5x=45$  nesta espécie.

Também por citometria de fluxo, Penteado et al. (2000) determinaram o nível de ploidia de uma coleção de germoplasma de 435 acessos, pertencentes a 13 espécies de *Brachiaria*. A citometria mostrou-se muito eficaz nesta determinação, possibilitando a análise de grande número de indivíduos. Foram observados vários níveis de ploidia para as diferentes espécies, alguns poucos relatados literatura, como o caso dos pentaplóides. Observou-se também grande variação nas quantidades totais de DNA, tanto entre como dentro de espécies.

Para *B. ruziziensis*, foi determinada a quantidade de DNA de acessos diplóides e tetraplóides induzidos por tratamento com colchicina. Os resultados

da citometria de fluxo foram totalmente coerentes com este conhecimento prévio e mostraram que na duplicação não houve perda ou alterações nas quantidades de DNA, pois os diplóides apresentaram índice 1,00 na citometria, enquanto que nos tetraplóides esse valor variou de 1,87 a 2,18. Com base nesses dados, verificou-se que *B. decumbens*, *B. ruziziensis*, *B. dictyoneura*, *B. platynota* possuem quantidades de DNA muito semelhantes, apresentando índice 1,00 para o nível diplóide (PENTEADO et al., 2000). A mesma autora afirmou que a citometria de fluxo permitiu uma precisão e rapidez na determinação do nível de ploidia da coleção do germoplasma que consistia em 435 acesso de pelo menos 13 espécies de *Brachiaria*,

Ishigaki (2010) também utilizou da citometria de fluxo para estimar o tipo de genoma de quatro espécies de *Brachiaria* afirmando ser uma técnica com acurácia e eficiente para esse objetivo. Este autor revelou diferentes tipos de genomas (C – quantidade de DNA gamético e Cx quantidade de DNA de cada genoma), entre as cultivares, sendo que valores de C aumentaram de acordo com aumento do nível de ploidia assim como observado por Timbó (2010) . Entretanto houve uma diferença média variando de 222 a 316 Mpb nas estimativas do valor C médio entre o trabalho de Timbó (2010) , encontrando para 2x foi de 852,1 Mpb do 3x foi de 1257 Mpb e dos 4x de 1829 Mpb e o do Ishigaki et al. (2010). Provavelmente se deve as diferença nos genótipos dentro das espécies, na metodologia empregada tanto no preparo da amostra como na conversão de pg para Mpb.

Já os resultados de Cx observados por Ishigaki (2010) mostrou maiores valores em cultivares apomíticas comparada com a sexual concluindo que o tipo de genoma depende também do modo de reprodução, apresentaram resultados condizentes com a conclusão.

Ishigaki et al. (2009) obtiveram valores para o conteúdo de DNA de *B. ruziziensis* sendo: 1,41 pg para as plantas diploides e 2,77 pg para as plantas



tetraploidizadas e Timbó (2010) relatou a quantidade média de DNA nos acessos de *B. ruziziensis* foi de 1,74 pg para os genótipos 2x afirmando que essas diferenças de valores nas estimativas do conteúdo de DNA se dever a vários fatores como, por exemplo: calibração do aparelho, padrão de referência, material vegetativo, tampão de extração dos núcleos e fluorocromo utilizados.

## REFERÊNCIAS

- AKIN, D. E. Histological and physical affecting digestibility of forages. **Agronomy Journal**, v. 21, n. 1, p. 17-25, 1989.
- AKIN, D. E. Rumen microbial degradation of grass tissue revealed by scanning electron microscopy. **Agronomy Journal**, v.65, n. 5, p.825-828,1973.
- AKIN, D. E.; BURDICK, D. Percentage of tissue types in tropical and temperate grass leaf blades and degradation of tissues by rumen microorganisms. **Crop Science**, v.15, n.5, p.661-668, 1975.
- AKIN, D.E. et al. Temperatures effects on leaf anatomy, phenolic acids and tissue digestibility in tall fescue. **Agronomy Journal**, v.79, n.2, p.271-75, 1987.
- AKIYAMA Y. et al. Estimation of genome size and physical mapping of ribosomal DNA in diploid and tetraploid guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). **Grassland Science**, v.54, n.2, p.89-97, 2008.
- ALCANTARA, P.B. Origem das braquiárias e suas características morfológicas de interesse forrageiro. In: ENCONTRO SOBRE CAPINS DO GÊNERO *BRACHIARIA*, 1986, Nova Odessa, SP. **Anais...** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1987. p.1-18.
- ALVES DE BRITO, C.J.F. **Organização estrutural e degradação in vitro de tecidos em *Pennisetum purpureum* Schum. (Poaceae)**. 1997. 119p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.
- ALVES DE BRITO, C.J.F. et al. Anatomia quantitativa e degradação *in vitro* de tecidos em cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.2, p.223-229, 1999.
- ARAUCÁRIA SEMENTES. *Brachiaria ruziziensis*: pastagens. Disponível em: <<http://www.sementesaraucaria.com.br/ruziziensis.php>>. Acesso em: 18 jun. 2010.
- ASHTON, P.M.S; BERLYN, G.P. Leaf adaptations of some *Shorea* species to sun and shade. **New Phytologist**. v. 121, n.4, p. 587-596. 1992.

BASAPPA, G. P.; MUNIYAMMA M.; CHINNAPPA C. C. An investigation of chromosome numbers in the genus *Brachiaria* (Poaceae:Paniceae) in relation to morphology and taxonomy. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, n.11, p. 2297-2309, 1987.

BERNINI, C. **Análise citogenética e diferenciação cromossômica em espécies do gênero *Brachiaria Grisebach***. 1997. 97 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral) - Universidade Estadual de Londrina , Londrina, 1997.

BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios**, v. 104, n. 407, p. 157-171, 2001.

BENNET, M.D., LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses - 807 new estimates. **Annals of Botany, Bristol**, v.86, n. 4, p.859-909, 2000.

BOGDAN, A.V. **Tropical pasture and fodder plants**. New York: Longman, 1977. 475p.

BOLDRINI, K.R., PAGLIARINI M.S.; VALLE C.B. Meiotic behavior of a nonaploid accession endorses  $x = 6$  for *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n.4, p. 1444-1450, 2009.

BOS, I.; GALIGARI, P. **Selection methods in plant breeding**. London: Chapman & Hall. 1997. 347 p.

BRITO, C.J.F.A. et al. Anatomia quantitativa e degradação *in vitro* de tecidos em cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.2, p.223-229, 1999.

BRITO, C. J. F. A. de; RODELLA, R. A. Breve histórico das relações entre anatomia vegetal e qualidade de gramíneas forrageiras com ênfase para o gênero *Brachiaria*. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 76, v.1, p. 19-36, 2001.

CHESSON, A. et al. Degradation of isolated grass mesophyll, epidermis and fibre cell wall in the rumen and by cellulolytic rumen bacteria in axenic culture. **Journal of Applied. Bacteriology**, v.60, n.4, p.327-36, 1986.

DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas of flowering plants**. London: Allen & Unwin, 1955. 519 p.

DIMITROVA, D., GREILHUBER, J. Karyotype and DNA-content evolution in ten species of *Crepis* (Asteraceae) distributed in Bulgaria. **Botanical Journal of the Linnen Society of London**, London, v.132, n.3, p.281-197, 2000.

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 38, n.3, p. 285-302, 1997

DUJARDIN, M. Additional chromosome numbers and meiotic behavior in tropical African grasses from western Zaire. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n.8, p. 864-876, 1979.

FERGUSON, J. E. ; CROWDER L. V. Cytology and breeding behavior of *Brachiaria ruziziensis*. **Crop Science**, v.14, n.6, p. 893-895, 1974.

FERNANDES, C. D. et al. Ameaças apresentadas pelo atual sistema de produção de sementes à agropecuária na transmissão de doenças e pragas. In: WORKSHOP SOBRE SEMENTES DE FORRAGEIRAS, 1., 1999, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa Negócios Tecnológicos, 2000. p. 55-68.

HACKER, J.B. Sexuality and hybridization in signal grass, *Brachiaria decumbens*. **Tropical Grassl**, v.22, n.3, p. 139-44, 1988.

HALIM, R.A., et al. Water-stress effects on alfalfa forage quality after adjustment for maturity differences. **Agronomy Journal**, v.81, n.1, p.189-194, 1989.

HANNA, W.W.; MONSON, W.G.; BURTON, G.W. Histological examination of fresh forages leaves after *in vitro* digestion. **Crop Science**, v.13, n.1, p.98-102, 1973.

HATFIELD, R.D. et al. A comparison of the insoluble residues produced by klason lignin and acid detergent lignin procedures. **Journal of Science Food Agriculture**, v.65, v.1, p.51-58, 1994.

HUGHES, N.R.G. et al. Shearing strength as an additional selection criterion for quality in *Brachiaria* pasture ecotypes. **Journal of Agricultural Science** v. 135, n.2, p. 123-130, 2000.

ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. **Japanese Society of Grassland Science**, Tokyo, v. 55 n. 3, p. 164-170, 2009.

ISHIGAKI, G. et al. Estimation of genome size in *Brachiaria* species. **Japanese Society of Grassland Science**, Tokyo, v. 56, n. 4, p. 240-242, 2010.

ITO, M. et al. Characterization of spinach chromosomes by condensation patterns and physical mapping of 5S and 45S rDNAs by FISH. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.125, n.1, p.59–62, 2000.

JUNG, H.G.; ALLEN, M.S. Characteristics of plant cell wall affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.73, n.9, p. 2774-2790, 1995.

JUNG, H.G.; CASLER, M.D. Relationship of lignin and esterified phenolics to fermentation of smooth bromegrass fibre. **Animal Feed Science and Technology**, v.32, n.1, p. 63-68, 1991.

JUNG, H.G.; VOGEL, K.P. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. **Journal of Animal Science**, v.62, p.1703-1712, 1986.

JUNG, H.G.; VOGEL, K.P. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum*) and big bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.59, n.2, p. 769-776, 1992.

JUNG, H.G.; SMITH, R.R.; ENDRES, C.S. Cell wall composition and degradability of stem tissue from Lucerne divergently selected for lignin and in vitro dry matter disappearance. **Grass Forage Science**, v. 49, n.3, p. 295-299, 1994.

JUNG, H.G., MERTENS, D.R., PAYNE, A.J. Correlation of acid detergent lignin and klason lignin with digestibility of forage dry matter and neutral detergent fiber. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.8, p.1622-1628, 1997.

KAMSTRA, L.D. et al. The effect of stage of maturity and lignification on the digestion of cellulose in forage plants by rumen microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v.17, p.199-208, 1958.

KELLER-GREIN, G. et al. Natural variation in *Brachiaria* and existing germoplasma collections. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. (Eds.). In: MILLES, J. Maas, B. L.; VALLE, C. B. do (Eds.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; Brasília: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 17-42. (CIAT Publication, 256).

LEMPP, B. et al. Proporção e arranjo de tecidos de nove acessos de *Brachiaria brizantha*. In: REUNIÃO ANUAL [DA] SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. 5 p. 1 CD-ROM.

LETTERIELLO, G. et al. Citologia e modo de reprodução de acessos pentaplóides de *Brachiaria brizantha*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SBZ, 1999. 1 CD-ROM.

LEMPP, B.; et al. Observação da estrutura girder na taxa de digestão dos tecidos em lâminas de *Panicum maximum* Jacq. cv. aruana e vencedor. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora:SBZ, 1997. p.12-14.

LEMPP, B.; EZEQUIEL, J.M.B.; SANTOS, J.M. et al. Observação da taxa de digestão das células de mesofilo de duas cultivares de *Panicum maximum* Jacq., águas e seca. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu:SBZ, 1998. p.269-71

LYSÁK, M.; DOLEŽEL, J. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). **Caryologia**, v.52, n.2, p. 123-132, 1998.

MACADAM, J. W.; KERLEY, M. S.; PIWONKA, E. J. Tiller development influences seasonal change in cell wall digestibility of big bluestem (*Andropogon gerardii*). **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 70, n.1, p. 79-88, 1996.

MARTEL, E. et al. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen McLEISH, related Pennisetum species. **Journal of Heredity**, v.88, n.2, p. 139-143, 1997.

MENDES, D. V. et al. Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 150, n.4, p. 441-446, 2006.

MENDES-BONATO, A. B. et al. Chromosome number and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica**, v.125, n. 3, p. 419-425, 2002.

MENDES-BONATO, A. B. et al. **Caracterização citogenética de acessos de *Brachiaria brizantha* (Gramineae)**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 31 p. (Embrapa Gado de Corte. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15)

MENDES-BONATO, A. B. Cytogenetic evidence for elimination during microsporogenesis in interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n.4, p. 711-714, 2006.

MENDES-BONATO, A. B et al. Chromosome number and meiotic behavior in *Brachiaria jubata* (Gramineae). **Journal of Genetics**. v. 85, n.1, p. 83-87, 2006.

MILES, J. W. Nuevos híbridos de *Brachiaria*. **Pasturas Tropicales**, v. 21, n.2, p. 78-80, 1999.

MILES, J. W.; VALLE, C. B do. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding In: MILES J. W.; MAASS B. L.; VALLE, C. B. do (Eds.) **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. CIAT/Brasília:EMBRAPA-CNPQC, p. 164-177. 1996. (CIAT Publication, n. 259).

MINSON, D.J. Effect of chemical composition on feed digestibility and metabolizable energy. **Nutrition Abstracts and Reviews**, v.52, n.10, p. 592-614, 1982.

MORRONE, O.; ZULOAGA, F. O. Revision de las especies sudamericanas nativas e introducidas de los géneros *Brachiaria* e *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Darwiniana**, v. 31, n. 14, p. 43-109, 1992.

PACIULLO, D. S. C. **Características anatômicas e nutricionais de lâminas foliares e colmos de gramíneas forrageiras, em função no nível de inserção no perfilho, da idade e da estação de crescimento**. Viçosa-MG, 2000. 104p. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PACIULLO, D. S. C. et al. Correlações entre componentes anatômicos, químicos e digestibilidade in vitro da matéria seca de gramíneas forrageiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 30, n. 3, p. 955-963, 2001. Suplemento.

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

PENTEADO, M. I. de O. et al. **Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2000. 32 p. (EMBRAPA Gado de Corte. Boletim de Pesquisa, 11).

PEREIRA, A. V. et al. Melhoria de Forrageiras Tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoria de plantas**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.

PETERS, M.; LASCANO, C. E. Forage technology adoption: linking on-station research with participatory methods. **Tropical Grasslands**, Melbourne, v. 37, n. 4, p. 197-203, 2003.

POSSENTI, R. A.; VALARINI, M. J. Degradabilidade ruminal *in situ* de leguminosas forrageiras tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: SBZ, 2003. 5 p. CD-ROM.

QUEIROZ, D.S. **Características anatômicas, químicas e digestibilidade in vitro de três gramíneas forrageiras**. 1997. 90p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

QUEIROZ, D. S.; GOMIDE, J. A.; MARIA, J. Avaliação da folha e do colmo de topo e base de perfilhos de três gramíneas forrageiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, n. 1, p. 61-68, jan./fev. 2000.

REEVES, J.B. Lignin and fiber composition changes in forages over a growing season and their effects on in vitro digestibility. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.8, p.1583-1594, 1987.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae:Paniceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, n.1, p. 7-10, 2006.

SAVIDAN, Y.H. ; VALLE, C.B. do. **Amélioration génétique des graminées fourragère tropicales**. In: Roberge G & Toutain B (Eds.). Cultures fourragères tropicales. Montpellier, La Librairie du CIRAD - Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement. 1999, p. 53-68.

SENDULSKY, T. **Chave para identificação de *Brachiaria***. J. Agroceres, v. 5, n.56, p. 4-5, 1977.

SEIFFERT, N.F. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. Circular Técnica. Campo Gande: EMBRAPA Gado de Corte, EMBRAPA, 1980. 83p.(EMBRAPA Gado de Corte. Circular Técnica, 1)



SILVA, D. J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UFV, 2002. 235p.

SCHIFINO-WITTMANN M.T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, v.31. n. 5, p. 897-902, 2001.

SYLVESTER, A. W. et al. Leaf shape and anatomy as indicators of phase in the grass: comparison of maize, rice and bluegrass. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 12, p. 2157-2167, 2001.

SOARES FILHO, C. V. **Brachiaria – Espécies e variedades recomendadas para diferentes condições**. Campinas: CATI, 1996. 26 p. (Boletim Técnico, 226).

SOUZA SOBRINHO, F. Melhoramento de forrageiras no Brasil. In: SIMPOSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 5., 2005, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2005a. 1CD-ROM.

SOUZA SOBRINHO, F. et al. Produtividade e qualidade da forragem de Brachiaria na região Norte Fluminense. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42. Goiânia, GO. 2005b. **Anais...** Sociedade Brasileira de Zootecnia, Goiânia, GO, 2005b.

SOUZA SOBRINHO, F. et al. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 9, p. 873-880, set. 2005c.

SOTOMAYOR-RIOS, A. et al. Description and cytology of a form of Signalgrass (*Brachiaria brizantha* Stapf.) and its agronomic behavior compared to Guinea grass (*Panicum maximum* Jack.). **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 44, n.4, p. 208–220, 1968.

TERRY, R.A.; TILLEY, J.M.A. The indigestibility of the leaves and stems of perennial ryegrass, cocksfoot, timothy, tall fescue, lucerne and sainfoin as measured by in vitro procedure. **Journal of British Grassland Society**, v.19, n.4, p.362-372, 1964.

TIMBÓ, A. L. de O. **Duplicação cromossômica e identificação do nível de ploidia utilizando citometria de fluxo em *Brachiaria* spp.** 2010. 100p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

TOHME, J.; PALACIOS, N.; LENIS, S. Applications of biotechnology to *Brachiaria*. In: MILLES, J. Maas, B. L.; VALLE, C. B. do (Eds.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; Brasília: EMBRAPA-CNPGC, 1996. p. 147-163. (CIAT Publication, 256).

TWIDWELL, E.K.; JOHNSON, K.D.; CHERNEY, J.H. Degradation of switchgrass anatomical tissue by rumen microorganisms. **Crop Science**, v.30, n.6, p.1321-28, 1991.

UTSUNOMIYA K. S., PAGLIARINI M. S.; VALLE C. B. 2005  
Microsporogenesis in tetraploid accessions of *Brachiaria nigropedata* (Ficalho & Hiern) Stapf (Gramineae). *Biocell* 29, n.3, 295–301.

VALLE, C. B. do; SINGH, R. J.; MILLER, D. A. Pachytene chromosomes of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. **Plant Breeding**, Berlin, v. 78, n.1, p. 75-78, 1987.

VALLE, C. B. do; MOORE, K. J.; MILLER, D. A. Cell wall composition and digestibility in five species of *Brachiaria*. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 65, n. 4, p.337-340, Oct. 1988.

VALLE, C. B. do. Genetic resources for tropical areas: achievements and perspectives. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, Piracicaba. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 477-482.

VALLE, C. B. do; SAVIDAN, Y. H. Genetics, cytogenetic and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; Brasília: EMBRAPA-CNPGC, 1996. p. 147-163. (CIAT Publication, 256).

VALLE, C. B. do et al. Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do; JANK, L. (Ed.). **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 2008. p. 13-53.

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

WILSON, J.R. 1982. Environmental and nutritional factors affecting herbage quality. In: J.B. Hacker (Ed.). *Nutritional limits to animal production from pastures*. Sta. Lucia: Commonwealth Agricultural Bureaux. p. 111-131.

WILSON, J.R.; BROWN, R.H.; WINDHAM, W.R. Influence of leaf anatomy on the dry matter digestibility of C3, C4, and C3/C4 intermediate types of *Panicum* species. **Crop Science**, v. 23, n. 1, p. 141-146, 1983.

WILSON, J.R. DEINUM, B. ENGELS, F.M. Temperature effects on anatomy and digestibility of leaf and stem of tropical and temperate forage species. **Netherlands. Journal of Agricultural Science**, v.39, n.1, p.31-48, 1991.

WILSON, J.R. Structural and anatomical traits of forages influencing their nutritive value for ruminants. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 1997, Viçosa. **Anais...** Viçosa : UFV, 1997. p.173-208.

ZIMMER, A. H.; EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M. Manejo de plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 9., 1988, Piracicaba,. **Anais...** Piracicaba, FEALQ, 1988. p. 141-183.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

### ARTIGO 1

#### CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS ADAPTATIVAS DE GENÓTIPOS DE *Brachiaria ruziziensis* EM DIFERENTES AMBIENTES

##### Resumo

O estudo da interação genótipo com ambiente é de grande importância para os programas de melhoramento que visam obter materiais promissores em diversos ambientes ou ambientes específicos. O objetivo deste trabalho foi realizar a análise de características anatômicas nas folhas de clones de *B. ruziziensis* cultivados na época das águas (outubro a março) e da seca (abril a setembro). Folhas completamente expandidas, na segunda gema da parte superior para basal das plantas foram coletadas e fixadas em FAA<sub>70</sub> por 72h e armazenadas em álcool 70%. Amostras foliares na parte mediana foram avaliadas de acordo com os procedimentos usuais de anatomia vegetal. Foram feitas as análises de variância conjunta e individual e os desdobramentos para as épocas da água e seca. Os genótipos 15, 27, 29, 40, 44, 53 e o 90, comportaram de maneira diferente entre épocas (plasticidade morfológica) com pelo menos quatro das nove variáveis. Já os genótipos 1, 8, 13, 14, 21, 23, 33, 43, 56, 77, 83 e o 100 comportaram de maneira semelhante nos dois ambientes de cultivo em pelo menos oito das variáveis avaliadas sendo promissos para o melhoramento que visam obter materiais em diversas condições edafoclimáticas. Exceto para espessura das epidermes abaxial (EBA) e abaxial (EDA), os genótipos apresentaram comportamento diferente para as demais características avaliadas: espessura do mesofilo (EM), diâmetro do xilema (DX), distância entre feixes (DF), número de feixes (NF) e de células buliformes (NCB), área do tecido esclerenquimático (AES) e das células buliforme (ACB). Entretanto, os materiais apresentaram variabilidade.

**Palavras-chave:** anatomia foliar, *Brachiaria ruziziensis*, melhoramento genético.

**Abstract**

The study of genotype with environment interaction is of great importance for breeding programs that aim to obtain promising materials in various environments or specific environments. The objective of this work was the analysis of anatomical features in leaves of clones of *B. ruziziensis* cultivated in the rainy season (October to March) and dry (April-September). Fully expanded leaves, the second gem from top to basal plants were collected and fixed in FAA70 for 72h and stored in 70% alcohol. Leaf samples were evaluated at the median according to the usual procedures of plant anatomy. We made the analysis of variance and individual and the consequences for the water and dry seasons. Genotypes 15, 27, 29, 40, 44, 53 and 90, behaved differently between seasons (morphological plasticity) with at least four of the nine variables. Genotypes 1, 8, 13, 14, 21, 23, 33, 43, 56, 77, 83 and 100 produced similar results in both environmental conditions in at least eight of the variables assessed and commitments for improvements aimed at obtaining materials in various climate conditions. Except for the thickness of the abaxial epidermis (EBA) and abaxial (EDA), the genotypes showed different behavior for the other traits were: thickness of the mesophyll (MS), diameter of the xylem (DX), distance between beams (DF), number of beams (NF) and cells bulliform (NCB), area of sclerenchyma (AES) and bulliform cells (CBA). However, the materials showed variability.

**Keywords:** leaf anatomy, *Brachiaria ruziziensis*, breeding

## 1. Introdução

Em plantas forrageiras, a folha representa a principal fonte de matéria seca para ruminante e, por isso é um dos mais importantes órgãos da planta usados para determinar a produtividade e a qualidade de uma espécie para ser usada na nutrição animal. Ela também é o órgão da planta que apresenta alta plasticidade morfológica, ou seja, capacidade, habilidade e mudança na expressão genética em resposta a distintos ambientes (BRADSHAW, 1965; SULTAN, 2004).

A plasticidade pode ser evidenciada por alterações morfológicas, fisiológicas ou bioquímicas podendo afetar características estruturais e a proporção dos tecidos da planta, notadamente na folha, tais como: espessura do mesofilo e da parede celular, número de feixes e de células buliformes, distância entre os feixes vasculares, espessura das epidermes abaxial e adaxial, densidade estomática .

De acordo com Carvalho e Pires (2008), nenhum fator isolado afeta tanto a qualidade da forragem quanto a idade, embora o ambiente no qual a planta se desenvolve também desempenha papel relevante. As condições de intensidade e qualidade da luz (radiação), disponibilidade hídrica, temperatura, fotoperíodo, e diferentes condições edáficas são determinantes nas respostas do desenvolvimento das forrageiras nos diversos ambientes.

Vários autores têm pesquisado a relação das características anatômicas com os fatores ambientais (ASHTON; BERLYN, 1992; CASTRO et al., 2005; MARTINS et al., 2009; MELO et al., 2007; NAPP-ZINN, 1988; NERY et al., 2007; PACIULLO et al., 2001; 2002; PINTO et al., 2007; VIEIRA, 1990; VIEIRA; MACHADO, 1992). Trabalhos vêm destacando a influência da quantidade da radiação luminosa sobre a organização dos tecidos como Vieira

(1995), Smith et al. (1998). Outros têm relacionado o número de feixes com as condições de disponibilidade de água (DENARDI; MACHIORI 2005).

A plasticidade morfológica, segundo Via e Lande (1985) é um atributo comum das espécies que apresentam vantagens adaptativas em diversas condições edafoclimáticas, visto que as mudanças morfológicas podem facilitar na tolerância ambiental. Espera-se que plantas que ocupam ambientes heterogêneos apresentem um grande potencial plástico em suas características fisiológicas e/ou morfológicas (FUZETO; LOMÔNACO, 2000).

Essa plasticidade fenotípica é detectada pela interação genótipo x ambiente que significa diferentes respostas dos genótipos nos ambientes de avaliação. A seleção e recomendação dos genótipos mais produtivos em um programa de melhoramento é um objetivo básico que geralmente é avaliada com o desempenho dos genótipos nos diversos ambientes. Entretanto dependendo da significância da interação pode ser recomendado para os diversos ambientes (não significativa) ou para ambientes específicos (significativa),

As gramíneas, em especial, têm um grande potencial na adaptação dos tecidos ao ambiente de forma a maximizar a função destes nas mais variadas condições edafoclimáticas. Dias Filho 2000; 2002 em seu trabalho com *Brachiaria brizantha* encontrou redução da capacidade fotossintética em ambiente sombreado, mesmo assim apresentou plasticidade morfológica e tolerância ao sombreamento. Carvalho et al. (2002) estudaram desempenho de seis gramíneas sob condições de luz direta e sombreada em sistema silvipastoris; somente uma não tolerou o sombreamento, apresentando menor desempenho devido a restrição de luz nesse sistema.

Para os melhoristas, informações sobre o grau de plasticidade morfológica e/ ou anatômica são de extrema importância devido às diversas condições edafoclimáticas encontradas no Brasil e considerando que características anatômicas interferem na qualidade da forrageira (ALVES DE

BRITO et al., 1999). Paciullo (2001; 2002) estudos como estes são recentes, especialmente, quando se trata de análises comparativas das forrageiras em diferentes estações do ano. Isso enfatiza a necessidade de um aprofundamento de trabalhos dessa natureza, já que há escassez de pesquisadores atuando nessa área, principalmente que analisem a estrutura anatômica foliar em diferentes tipos de clima (PACIULLO et al., 2002).

Este trabalho teve por objetivos avaliar as características anatômicas de genótipos de *B. ruziziensis*, nas épocas chuvosa e seca do ano, e identificar aqueles com potencial para uso no programa de melhoramento de plantas.

## **2. Material e Métodos**

Foram avaliados 38 genótipos de *Brachiaria ruziziensis* oriundos do programa de melhoramento desta espécie, desenvolvido pela Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora-MG, em parceria com a Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG. Esses materiais foram cultivados no Campo Experimental de Coronel Pacheco (MG), onde esta localizada a Estação Climatológica da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora –MG.

Os dados climáticos (luminosidade, temperatura, insolação, umidade e precipitação), cujos valores médios estão apresentados na Tabela 1, foram obtidos junto à Estação Meteorológica situada no Campo Experimental de Coronel Pacheco (MG) da Embrapa Gado de Leite.



**Tabela 1** – Variáveis climáticas médias observadas no período experimental. Dados fornecidos pela Estação Climatológica do Campo Experimental de Coronel Pacheco (MG) da Embrapa Gado de Leite.

Meses/Ano	Umidade				
	Relativa (%)	Temperatura (°C)	Insolação (hora/mês)	Luminosidade (watt/m <sup>2</sup> )	Precipitação (mm/Mês)
jan/09	92,50	24,08	183,75	621,25	38
fev/09	89,61	24,15	207,68	642,14	118
mar/09	88,00	24,69	215,75	645,00	42,4
abr/09	87,67	20,20	214,67	621,67	0,2
mai/09	91,29	19,18	149,94	578,71	3,8
jun/09	90,13	17,22	153,77	553,33	37,6
jul/09	88,97	18,92	158,23	561,13	3,2
ago/09	86,16	18,64	164,90	589,19	4,2
set/09	84,33	22,08	192,63	609,83	113,4
out/09	89,26	22,23	159,21	600,00	58

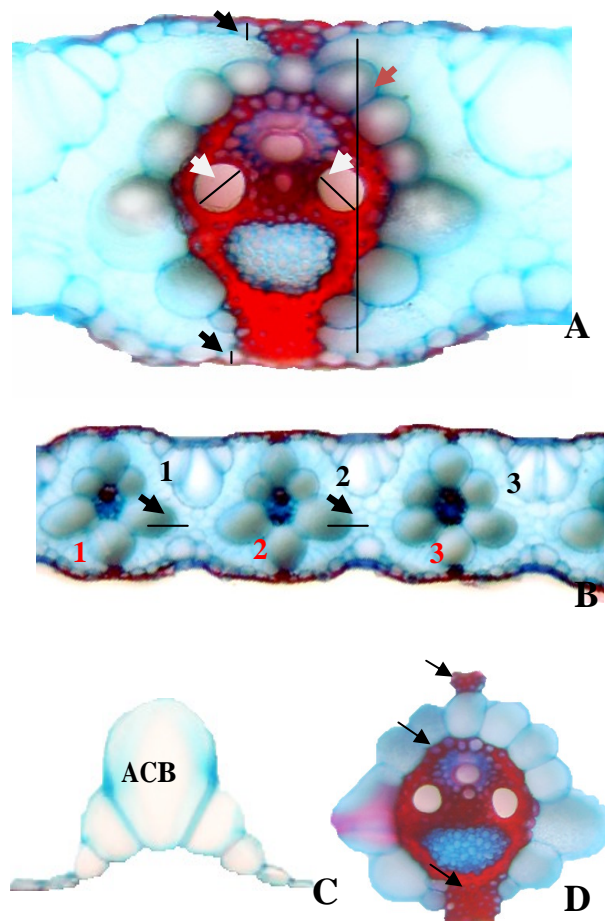
Foram realizadas coletas de amostras de forragem de cada um dos materiais genéticos em duas épocas do ano de 2009, sendo uma realizada em 12 de março (44 dias), representativa da estação das águas (outubro a março) e a outra realizada em 31 de agosto (126 dias), representativa da estação da seca (abril a setembro). As datas mais próximas de realização dos cortes de avaliação do potencial produtivo e da qualidade da forragem que foram 27/01/2009, 16/03/2009 (48 dias), 27/04/2009 e 19/10/2009 (175 dias). No total foram realizados 8 cortes de avaliação.

Foram coletadas três folhas completamente expandidas localizadas na segunda gema do ápice para base no perfilho de cada genótipo. Estas folhas foram fixadas em F.A.A<sub>70</sub> (formaldeído: ácido acético glacial: álcool etílico) por 72 horas (KRAUS; ARDUIM, 1997) e posteriormente preservadas em etanol 70% até a data das análises. Utilizou-se micrótomo de mesa para obtenção de secções transversais do terço médio foliar. As secções foram clarificadas em

solução de hipoclorito de sódio 50%, sendo, em seguida, lavadas em água destilada, neutralizadas em água acética 1%, coradas com azul de astra-safranina (KRAUS; ARDUIN, 1997) e montadas em glicerina 50%.

Nas secções transversais das lâminas foliares, a partir de imagens capturadas por uma câmera acoplada a um microscópio, foram avaliadas as seguintes características: espessura do mesofilo (EM), espessura da epiderme abaxial (EBA) e adaxial (EDA), diâmetro do xilema (DX), distância entre os feixes vasculares (DF), número de feixes (NF), número de células buliformes (NCB), área das células buliformes (ACB), área do tecido esclerenquimático (AES) (Figura 1).

As medições foram realizadas em uma área selecionada entre o primeiro e o segundo feixes vasculares maiores subseqüentes, tendo o feixe central como referência (Figura 1), os quais também foram avaliados. O número de repetições das observações do campo para cada folha variou para cada característica analisada. Para avaliar a espessura da epiderme nas faces abaxial e adaxial, assim como do mesofilo, foram feitas mensurações em três regiões distintas de cada secção, com auxílio do software Image tool<sup>®</sup>, perfazendo um total de nove repetições por folha. Para as demais características, foram também observados duas regiões distintas de cada campo totalizando em seis repetições.



**Figura 1** - Fotomicrografias esquemáticas representando a padronização das medições A) As setas representam as medições das espessura das epidermes abaxial e adaxial (EBA e EDA) (preta), EM (vermelha) e diâmetro do xilema (DX) (branca). B) As setas e o número (preto) indicam as medições do distancia entre feixes (DF) e número de feixes (NF), respectivamente; o número (vermelho) indica o número de células buliformes (NCB). C) Área das células buliformes (ACB). D) Área do tecido esclerenquimático representada em vermelho escuro AES.

Os dados anatômicos foram submetidos à análise de variância individual (por estação), considerando um delineamento inteiramente casualizado. Procedeu-se à análise conjunta de acordo com o seguinte modelo estatístico:

O modelo estatístico adotado foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + g_i + e_j + ge_{ij} + f_{k(ij)} + c_{l(ijk)}$$

$Y_{ijk}$  = é a observação do genótipo i, na época j, na folha k, no corte l

$\mu$  = é a média geral;

$g_i$  = é o efeito fixo do genótipo i;

$e_j$  = é o efeito fixo da época j;

$ge_{ij}$  = é o efeito fixo da interação do genótipo i com a época j.

$f_{k(ij)}$  = é o efeito da folha k dentro da interação genótipo com a época.

$c_{l(kij)}$  = é o efeito do corte l dentro da folha k dentro da interação genótipo com a época.

Para as comparações entre as médias dos genótipos utilizou-se o teste de agrupamento Scott-Knott com 5% de probabilidade (Ramalho et al., 2007).

As análises foram realizadas com o auxílio do software SISVAR.

A qualidade experimental foi aferida pela estimação do parâmetro acurácia seletiva (RESENDE; DUARTE, 2007).

### 3. Resultados e Discussão

Na análise de variância individual (por época) apenas a AES não houve efeito significativo dos genótipos na época da seca ( $p > 0,05$ ). Para as demais características houve efeito significativo dos genótipos na análise em cada época (Tabelas 2 e 3). Na análise de variância conjunta de épocas (“águas” e “seca”) para todas as características avaliadas, o comportamento dos genótipos foi significativo ( $p < 0,01$ ) (Tabelas 4 e 5). Estas informações confirmam que os

genótipos apresentam variabilidade genética para as características anatômicas das folhas, que poderá ser explorada pelo melhoramento genético.

Exceto para NF, o qual apresentou acurácia moderada de 69,02% para o efeito dos genótipos, para as demais características avaliadas, a precisão experimental foi considerada alta, variando de 74,92% até 89,82%, conforme critérios de Resende e Duarte, (2007).

Quando se trata de intensidade luminosa, um grande número de trabalhos leva em consideração as variações na estrutura foliar (GIVNISH, 1988; VOGELMANN et al., 1996). Segundo Dickson (2000), a folha é o órgão da planta que mais responde anatomicamente às variações lumínicas de um determinado habitat. Esse mecanismo de alteração fenotípica de acordo com as condições ambientais é denominado de plasticidade morfológica. Diversos autores definem a plasticidade morfológica como a habilidade de um organismo alterar sua fisiologia e/ou morfologia em decorrência dessa interação genótipo com ambiente (BRADSHAW, 1965; SCHILICHTING, 1986; STEARNS, 1989; SCHEINER 1993).

Para as espessuras das epidermes (EBA e EDA) não foi observada diferença significativa entre épocas na análise conjunta ( $p > 0,05$ ), contudo foi observada interação genótipo com ambiente ( $p < 0,05$ ) (Tabelas 4, 5 e 6) (Tabela 4). O efeito das épocas (diferença entre épocas) para os genótipos 2, 27, 29, 40, 53, 54, 64, 71 e 97 foi significativo para EBA ( $p < 0,01$ ) (APÊNDICES A e B). Destes, os genótipos 29 e o 71 apresentaram as maiores médias na época da seca, com 5,38  $\mu\text{m}$  e 7,13  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Para os demais, as médias foram superiores na época das águas (APÊNDICES A e B). Em relação a EDA, os genótipos que tiveram efeito significativo entre épocas e apresentaram médias superiores estação das águas, são eles: 2, 27, 54 e o 97 ( $p < 0,05$ ), com médias de 7,60 , 7,55, 8,08 e 6,75  $\mu\text{m}$ , respectivamente (APÊNDICE A e B).

**Tabela 2** – Resumo da ANAVA individual por época, “águas” e “seca”, para as variáveis: espessura das epidermes abaxial -  $\mu\text{m}$ , (EBA) e adaxial -  $\mu\text{m}$  (EDA), espessura do mesofilo -  $\mu\text{m}$  (EM), distância entre os feixes -  $\mu\text{m}$  (DF) e diâmetro do xilema  $\mu\text{m}$  (DX).

Época	GL*	EBA		EDA		EM		DX	
		QM**	p***	QM	P	QM	P	QM	p
Água	37	1.93	<.0001	1.50	<.0001	527.76	<0.05	28.86	<.0001
Seca	37	1.51	<.0001	1.04	<.0001	756.24	<.0001	31.58	<.0001

\*GL-Grau de liberdade; \*\*QM- Quadrado Médio : \*\*\*p – grau de significância.

**Tabela 3** – Resumo da ANAVA individual por época, “águas” e “seca”, para as variáveis: espessura das epidermes abaxial - distância entre os feixes -  $\mu\text{m}$  (DF), número de feixes (NF) e células buliformes (NCB), área do de tecido esclerenquimático -  $\mu\text{m}^2$  (AES) e área da célula buliforme -  $\mu\text{m}^2$  (ACB).

Época	GL*	DF		NF		NCB		AES		ACB	
		QM**	p***	QM	p	QM	p	QM	p	QM	p
Água	37	29.75	>0.001	0.20	<0.05	0.26	0.00	3435778.00	<.0001	613076.00	<0.05
Seca	37	64.72	<.0001	0.22	<0.05	0.29	0.00	1164809.00	>0.05	1595476.00	<.0001

\*GL-Grau de liberdade; \*\*QM- Quadrado Médio : \*\*\*p – grau de significância.

**Tabela 4** – Resumo da ANAVA conjunta para espessura das epidermes abaxial -  $\mu\text{m}$ , (EBA) e adaxial -  $\mu\text{m}$  (EDA), espessura do mesofilo-  $\mu\text{m}$  (EM) e diâmetro do xilema  $\mu\text{m}$  (DX) nas épocas das águas e da seca dos 38 genótipos de *Brachiaria ruzizensis* em 2009.

FV	GL	EBA		EDA		EM		DX	
		QM	P	QM	P	QM	P	QM	P
G*	37	1.86	<0.01	1.64	<0.01	873.01	<0.01	45.59	<0.01
E**	1	1.75	>0.05	1.46	>0.05	14706.99	<0.01	2582.43	<0.01
G*E	37	1.57	<0.01	0.88	<0.01	410.99	<0.05	14.84	>0.05

\*G = Efeito dos Genótipos; \*\*E =Efeito de épocas(“águas” e “seca”);\*\*\* G\*E.

**Tabela 5** – Resumo da ANAVA conjunta para espessura das epidermes abaxial - distância entre feixes -  $\mu\text{m}$  (DF), número de feixes (NF) e células buliformes (NCB), área do tecido esclerenquimático-  $\mu\text{m}^2$  (AES) e área de células buliformes -  $\mu\text{m}^2$  (ACB) nas épocas das águas e da seca dos 38 genótipos de *Brachiaria ruzizensis* em 2009.

FV	GL	DF		NF		NCB		AES		ACB	
		QM	P	QM	p	QM	p	QM	p	QM	p
G*	37	69,25	<0,01	0,25	<0,01	0.32	<0,01	2464259,91	<0,01	1309206,73	<0,01
E**	1	80,85	<0,05	4,58	<0,01	3.86	<0,01	47010000,3	<0,01	29609052,68	<0,01
G*E***	37	25,21	<0,01	0,16	>0,05	0.22	<0,05	2136327,06	<0,01	899345,1	<0,01

\*G = Efeito dos Genótipos; \*\*E =Efeito de épocas(“águas” e “seca”);\*\*\* G\*E.

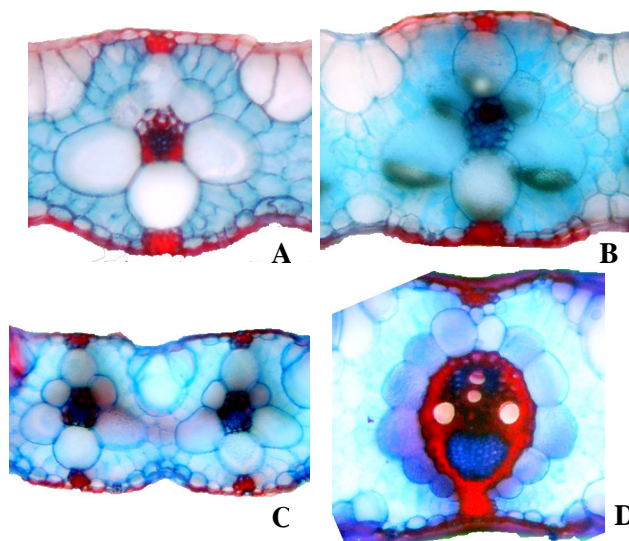
Observando os dados climáticos da Tabela 1, podemos constatar que os resultados obtidos para EBA e EDA, maiores nas épocas das águas que na seca, são coincidentes com a literatura. No mês de março (época das águas), os níveis de insolação hora/dia a luminosidade foram superiores aos observados no mês de agosto (época da seca). A variação das faces da epiderme é diferenciada em relação às variações na intensidade luminosa, podendo diminuir (DICKINSON, 2000; GRATANI et al., 2006; PANDEY; KUSHMAHA, 2005) ou aumentar (MORAIS et al., 2004; VOLTAN et al., 1992).

Considerando a variável EM, na análise conjunta houve diferença entre as épocas de cultivo ( $p < 0,05$ ) com maior média na seca comparada com as águas e também houve interação genótipo com ambiente (Tabela 4 e 6). Os genótipos 4, 6, 15, 29, 35, 40, 41, 44, 90, 93 e 97 (FIGURAS 2A–D) também apresentaram médias de magnitudes superiores na época da seca comparada com às águas, com valor médio de 170,68  $\mu\text{m}$  (APÊNDICES A e B).

A espessura do mesofilo pode ter sido influenciada ( $p < 0,05$ ) pelas condições de luminosidade e insolação, apresentando maior valor para a folhas no cultivo das “águas” (Tabelas 4 e 6).

Os resultados obtidos neste estudo não foram coincidentes com os encontrados na literatura, quando se considera as respostas esperadas frente aos índices de temperatura, insolação e luminosidade dos meses de agosto e março (Tabela1). O mesofilo tem a propriedade de absorção uniforme da luz que incide nas folhas. Para várias espécies, tem sido observado que as plantas, quando cultivadas em pleno sol, apresentam folhas bastante espessas devido ao desenvolvimento dos parênquimas paliçádico e esponjoso, o qual é induzido pela alta intensidade de luz, acarretando um aumento da área do mesofilo (ABRAMS et al., 1994; BOARDMAN, 1977; CUI et al., 1991; LEE et al., 2000).

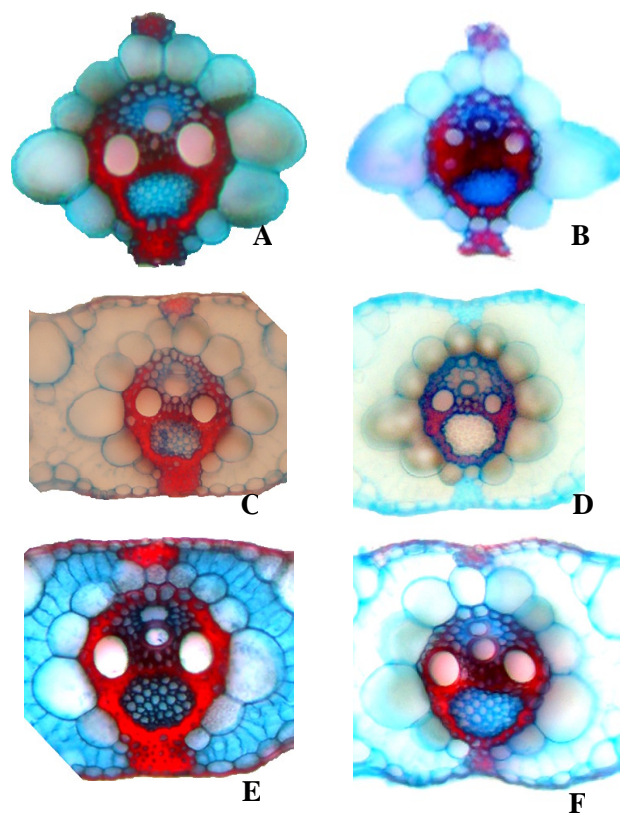




**Figura 2** – Fotomicrografias de secções transversais (Objetiva de 20x) dos genótipos 41 (A e B) e 29 (C e D) representando a diferença da espessura do mesofilo entre as épocas das águas (A e C) e da seca (B e D).

Quanto ao tecido esclerenquimático (AES), na análise conjunta observou-se diferença entre épocas com a maior média na época das águas e também interação do genótipo com ambiente (Tabelas 5 e 6). O maior efeito ambiental é provocado pela temperatura sob a qual a planta acelera seu desenvolvimento, além da lignificação da parede celular também há o aumento na proporção dos tecidos lignificados (ALVES DE BRITO et al., 1999; JUNG, 1989; PACIULLO et al., 2002 ; WILKINS, 1972;). Segundo Akin e Burdick (1973), os sítios de lignificação podem ser mais importantes que a quantidade de lignina presente na planta. Sua constituição predominante é a lignina, principal fator limitante da digestibilidade. Nove genótipos (3, 41, 44, 51, 58, 64, 66, 99, 100) apresentaram comportamentos distintos entre épocas, com médias superiores nas “águas” ( $p < 0,05$ ) (APÊNDICES A e B) (Figura 2 A-F). Neste

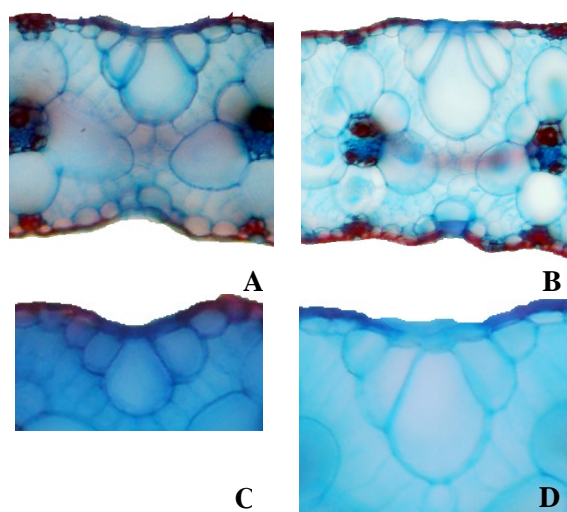
período, a temperatura, a insolação e a luminosidade foram maiores do que na época da seca (Tabela 1).



**Figura 3** – Fotomicrografias de secções transversais (Objetiva de 20x) dos genótipos 27 (A e B); 40 (C e D) e 41 (D e F) representando a diferença da área do esclerênquima entre as épocas da águas (A, C e E) e da seca (B, D e F).

Na análise conjunta, o número de células buliformes (NCB) apresentou diferença significativa entre épocas ( $p < 0,05$ ) com média de magnitude superior nas águas comparada com a seca, sendo a interação do genótipo com ambiente também significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5 e 6).

Constatando o efeito de épocas dentro de genótipos para NCB (Figura 2B), o genótipo 27 (na época da “seca”) com a média de 5,33 e os genótipos 15, 53, 70, 90, 93 e 96 (na época das “águas”), com valor médio de 5,35, apresentaram diferenças ( $p < 0,05$ ) entre as épocas (APÊNDICES A e B). Já a área dessas células (ACB) (Figura 4 A-D), em cada um dos treze genótipos (4, 6, 15, 21, 29, 40, 44, 48, 51, 54, 64, 90 e 93) na “seca”, as médias foram maiores comparadas às “águas” ( $p < 0,05$ ) (APÊNDICES A e B).



**Figura 4** – Fotomicrografias de secções transversais (Objetiva de 20x) dos genótipos 18 (A e B) e 7 (C e D); representando a diferença da área das células buliformes entre as épocas da águas (A e C) e da seca (B e D).

A presença das células buliformes foi constatada somente na parte adaxial, o que é comum em gramíneas (ELLIS, 1976). Os genótipos 8, 43, 44 e 58 formaram um agrupamento como as menores médias (4,38) ( $p < 0,05$ ) de NCB comparado com os demais. Já para ACB, foram formados dois grupos, sendo que o grupo com maiores médias foi composto por 14 genótipos, (2, 6, 7, 8, 21, 35, 40, 43, 51, 54, 56, 58, 64 e 97). Esta é uma das características que

pode ser usada como bom indicador do cultivo em ambientes com déficit hídrico ou altas temperaturas, pois as células buliformes estão envolvidas com o mecanismo de enrolamento foliar, de modo a diminuir superfície à perda de água por transpiração. Portanto, quanto maior a área de células buliformes, melhor a resposta do genótipo em relação às condições ambientais supra-citadas. Em um trabalho de Melo (2007), plantas de *Paspalum* submetidas às condições de deficiência hídrica tiveram grupos de células buliformes com um maior tamanho em altura quando comparadas às plantas do tratamento controle. Estes resultados corroboram com os obtidos neste estudo em que se observou maior área de células buliformes no cultivo na “seca”, período em que é necessário maior economia/aproveitamento de água pela planta devido a menor precipitação (Tabela 1).

Para o diâmetro dos vasos do metaxilema foi constada maior média na época das águas com resultados significativos na análise conjunta (Tabela 4 e 6). Não foi observada interação do genótipo com ambiente ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4). Cerca de 65% dos genótipos apresentaram diferenças avaliadas entre épocas (“águas” e “seca”), para a característica DX (Figuras 5 A-D), sendo todos com médias superiores nas “águas”(APÊNDICE A).

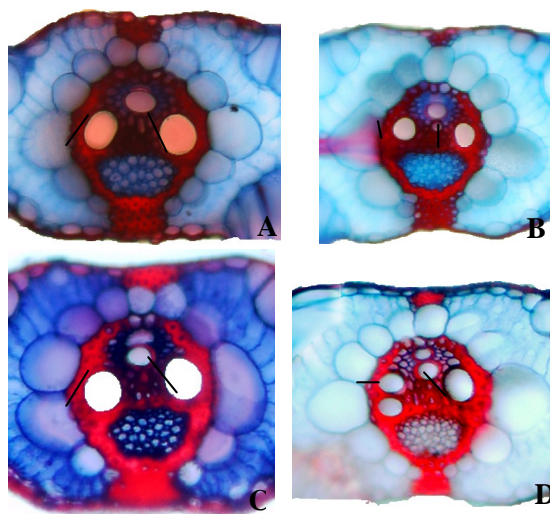
O diâmetro dos vasos do metaxilema também é um importante fator no fluxo de água, pois vasos com calibre maior são mais propensos à cavitação do que os de calibre menor (VASELLATI et al., 2001). Dickison (2000) estudou diversas espécies e afirmou que a frequência de vasos maior por milímetro quadrado dá mais segurança contra o embolismo em plantas que ocorrem em ambientes de condições secas. O teste Scott Knott resultou em três agrupamentos, sendo que o grupo com média inferior para o DX foi formado pelos genótipos 33, 48, 66 e o 93. Portanto, considerando o calibre do xilema, esses genótipos são interessantes para avaliação de cultivo na época da seca.

**Tabela 6** – Médias da ANOVA para as variáveis: espessura das epidermes abaxial - $\mu\text{m}$ , (EBA) e adaxial -  $\mu\text{m}$  (EDA), espessura do mesofilo -  $\mu\text{m}$  (EM), distância entre feixes -  $\mu\text{m}$  (DF), número de feixes (NF) e células buliformes (NCB), área do tecido esclerenquimático -  $\mu\text{m}^2$  (AES) e área de células buliformes -  $\mu\text{m}^2$  (ACB) nas épocas das águas e da seca dos 38 genótipos de *Brachiaria ruzizensis* em 2009.

Época	EBA	EDA	EM	DX	DF	NF	NCB	AES	ACB
Seca	6,37 a*	5,90 a	157,99 a	22,09 b	25,17 a	4,87 b	4,77 b	3437,13 b	4254,75 a
Água	6,54 a	6,06 a	141,92 b	28,82 a	23,98 b	5,15 a	5,03 a	4345,28 a	3534,01 b

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de F.

De acordo com Baas e Schweingruber (1987); Carlquist (1988); Alves e Angyalossy-Alfonso (2000), os fatores ambientais afetam as dimensões e até mesmo o arranjo dos elementos vasculares. Quando a planta está sujeita a algum tipo de estresse, a diminuição dos vasos condutores pode garantir um aumento na segurança do transporte de água, uma vez que fatores como seca, inundação, altitude, latitude, constituição e fertilidade do solo, estádios sucessionais da vegetação e poluição podem alterar significativamente sua estrutura anatômica (BAAS, 1983; BAAS; SCHWEINGRUBER, 1987; CARLQUIST; HOEKMAN, 1985). Esse comportamento parece ter sido observado nos genótipos avaliados na época da seca, os quais apresentaram menor diâmetro de feixes do xilema. Neste período, os genótipos sofreram com a escassez hídrica, pois a precipitação média em agosto/2009 foi de 0,14 mm (Tabela 1). Segundo Baas et al. (1983), vasos de maior diâmetro são mais eficientes, porém menos seguros devido ao maior risco de aparecimento de bolhas.



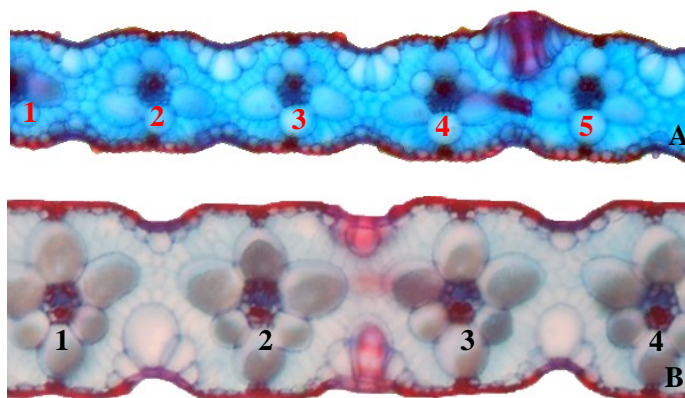
**Figura 5** – Fotomicrografias de secções transversais (Objetiva 20x) do genótipo 15 (A e B) genótipo 83 (C e D) representando a diferença entre as épocas do diâmetro do xilema entre as épocas das águas (A e C) e da seca (B e D).

A distância entre feixes na análise conjunta apresentou a média superior na seca em relação às águas e também interação do genótipo com ambiente (Tabelas 5 e 6). Com exceção do genótipo 13, na época das águas, com média de 26,18  $\mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ) para DF (Figura 6 A-B), os genótipos 7, 14, 29, 53 e 70 apresentaram valores superiores no cultivo na seca, variando de 30,99  $\mu\text{m}$  até 39,3  $\mu\text{m}$  (APENDICE A). Os dados climáticos observados no período do experimento (Tabela 1) mostram menores níveis de insolação e luminosidade na época da seca. Resultados semelhantes foram obtidos por Gobbi (2007) também em folhas de *Brachiaria*, em que a distância entre os feixes aumentou diretamente de acordo com os níveis de sombra.

A distância entre os feixes pode estar relacionada com o transporte e a distribuição mais eficiente de carboidratos e água para as células do mesofilo. Uma menor distância condiciona uma translocação de fotossintatos e maior distribuição de água em ambientes com restrição hídrica e altas temperaturas. Como a *B. ruziziensis* apresenta baixo crescimento no período da seca, os genótipos, 2, 9, 13, 15, 16, 86, 95 e o 97 com menor distância entre feixes podem apresentar vantagens para uso nos programas de melhoramento genético pelo fato da distribuição de água e sais minerais ser potencialmente mais eficaz e, conseqüentemente, podendo otimizar a produção. Essa mesma consideração pode ser feita para àqueles genótipos (2, 8, 13, 14, 15, 35, 43, 44, 58, 96, 100) que apresentaram maior número de feixes.

Na análise conjunta para o número de feixes foram observadas médias de maior valor nas águas além da interação significativa do genótipo com ambiente (Tabelas 5 e 6). Ao avaliar o número de feixes NF entre épocas, a maior média foi observada para o genótipo 27 (5,44), no período da seca, quando os níveis de luminosidade e insolação foram inferiores aos observados na época das águas (Tabela 1) . Os genótipos 15, 40, 48, 53, 90 e 96 ,

apresentaram médias diferentes com magnitudes superiores nas “águas” (APÊNDICE A).

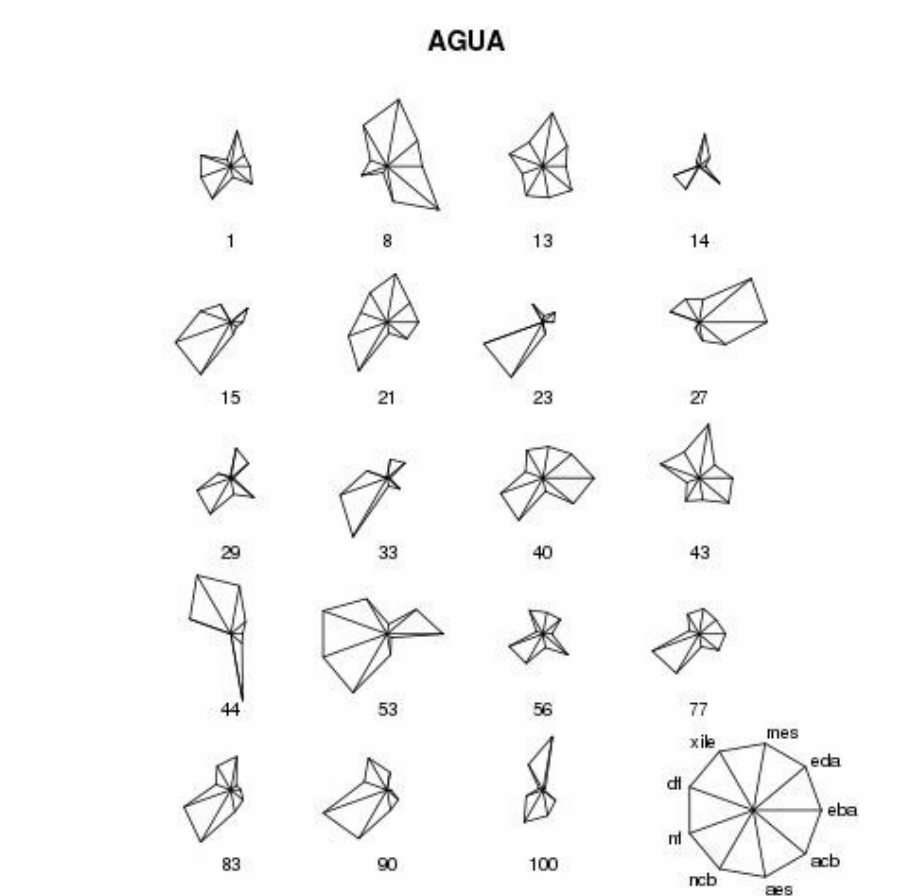


**Figura 6** – Fotomicrografias de secções transversais (Objetiva 10x) do genótipo 15 representando as diferença de numero de feixes e células buliformes entre as épocas das águas (A) da seca (B).

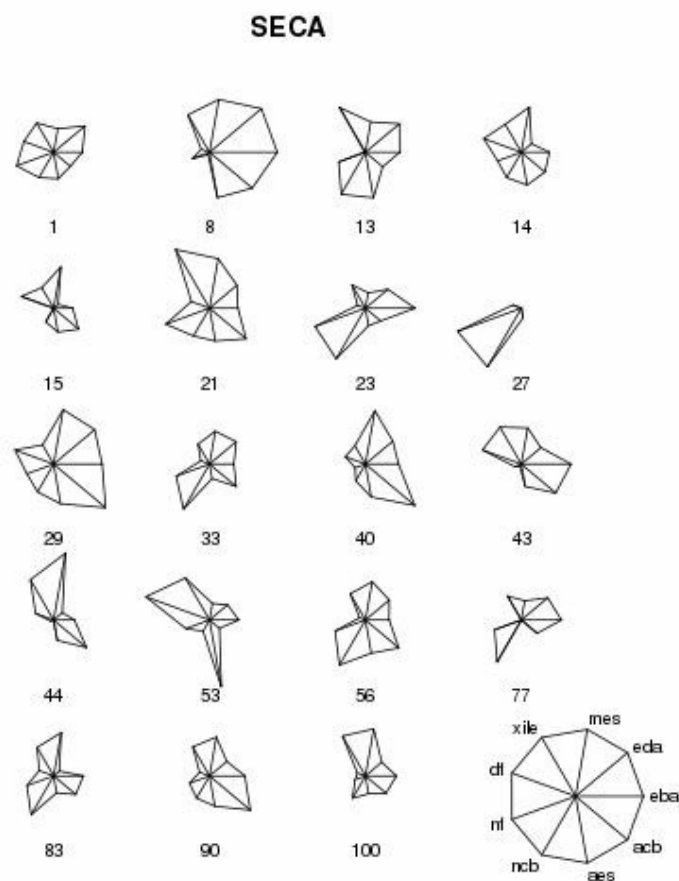
Os programas de melhoramento visam obter genótipos mais produtivos que podem ser cultivados em diversas condições edafoclimáticas, ou seja, não apresente a plasticidade fenotípica que é identificada pela interação genótipo com ambiente. Em espécies perenes como a *Brachiaria ruziziensis* um dos objetivos é obter materiais com comportamento uniforme em ambas estações, e não em ambientes específicos como águas e seca representado pela significância da interação genótipo com ambiente.

Nas figuras 7 e 8 demonstram os genótipos (15, 27, 29, 40, 44, 53 e o 9) com um maior número de características adaptáveis a ambientes específicos (águas e seca), ou seja, apresentaram comportamento distinto entre as duas épocas. Para, pelo menos, quatro das nove variáveis analisadas. Os genótipos 1, 8, 13, 14, 21, 23, 33, 43, 56, 77, 83 e o 100 apresentaram uma ou nenhuma interação genótipo com ambiente significativa das nove variáveis analisadas.





**Figura 7** – Representação do comportamento dos genótipos 1, 8, 13, 14, 15, 21, 23, 27, 29, 33, 40, 43, 44, 53, 56, 77, 83, 90 e o 100 na época das águas: diâmetro do xilema (XILE), distância entre feixes (DF), número de feixes (NF), número de células buliformes (NCB), área do tecido esclerenquimático (AES), área das células buliformes (ACB), espessura da epiderme abaxial e adaxial (EBA E EDA) e espessura do mesofilo (MES).



**Figura 8** – Representação do comportamento dos genótipos 1, 8, 13, 14, 15, 21, 23, 27, 29, 33, 40, 43, 44, 53, 56, 77, 83, 90 e o 100 na época da seca: diâmetro do xilema (xile), distância entre feixes (DF), número de feixes (nf), número de células buliformes (ncb), área do tecido esclerenquimático (aes), área das células buliformes (acb), espessura da epiderme abaxial e adaxial (eba e eda) e espessura do mesofilo (mes).

#### **4. Conclusão**

Considerando as características anatômicas avaliadas, existem genótipos promissores para uso no programa de melhoramento genético, pois a variabilidade anatômica foi evidente entre eles, exceto para EBA e EDA. Também foi constatada a variação entre épocas para as demais características.

A plasticidade morfológica foi evidente nos genótipos 15, 27, 29, 40, 44, 53 e o 90 os quais apresentaram interação com o ambiente para pelo menos quatro das nove características avaliadas e podem ser indicados para ambientes específicos. Diferente destes, os genótipos 1, 8, 13, 14, 21, 23, 33, 43, 56, 77, 83 e o 100, apresentaram interação em somente uma ou nenhuma das variáveis podendo ser indicados para as condições das épocas da água e da seca.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMS, M.D. et al. Relating wet and dry year ecophysiology to leaf structure in contrasting temperate tree species. **Ecology**, Washington, v.75, n.1, p.123-133, 1994.
- AKIN, D.E.; BURDICK, D. Microanatomical differences of warm-season grasses revealed by light and electron microscopy. **Agronomy Journal**, v.65, n.4, p.533-537, 1973.
- ALVES, E.S.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V. Ecological trends in the wood of some Brazilian species 1: growth rings and vessels. **IAWA Journal**, v.21, n.1, p.3-30, 2000.
- ALVES DE BRITO, C.J.F. et al. Anatomia quantitativa e degradação *in vitro* de tecidos em cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.2, p.223-229, 1999.
- ASHTON, M. S.; BERLYN, G. P. Leaf adaptations of some *Shorea* species to sun and shade. **New Phytologist**, v. 121, n. 4, p. 587-596, 1992.
- BAAS, P.; SCHWEINGRUBER, F.H. Ecological trends in the wood anatomy of trees, shrubs and climbers from Europe. **IAWA Bulletin.**, v.8, n.3, p.245-274, 1987.
- BAAS, P.; WHEELER, E.; FAHN, A. Some ecological trends in vessel characters. **IAWA Bulletin.** v. 4, n.2, p. 141-159, 1983.
- BOARDMAN, N. K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 28, p. 355-377, 1977.
- BRADSHAW, A.D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. **Advances in Genetics**, v.13, p. 115-155, 1965.
- CARLQUIST, S. ; HOEKMAN, D.A. Ecological wood anatomy of the woody southern Californian flora. **IAWA Bulletin**, v.6, n.4, p.319-347, 1985.
- CARLQUIST, S. **Comparative wood anatomy: systematic, ecological and evolutionary aspects of dicotyledons wood.** Springer Verlag, Berlin. 1988, 436p.

- CARVALHO, M.M.; FREITAS, V.P.; XAVIER, D.F. Início de florescimento, produção e valor nutritivo de gramíneas forrageiras tropicais sob condição de sombreamento natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 5, May 2002.
- CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V. Organização dos tecidos de plantas forrageiras e suas implicações para os ruminantes. **Archivos de Zootecnia**, v.57, p. 13-28, 2008.
- CASTRO, E. M. de et al. Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de guaco submetidas a diferentes fotoperíodos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, July 2005 .
- CUI, M. et al. Chlorophyll and gradients in sun and shade leaves of *Spinacia oleracea*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.14, n.5, p.493-500, 1991.
- DENARDI, L.; MARCHIORI, J.NC. Anatomia ecológica da madeira de *Blephatocalyx salicifolius* (H.B.K.). **Berg Ciência Florestal**, v.15, n.2, p. 119-127, 2005.
- DIAS FILHO, M.B. Growth and biomass allocation of the C4 grasses *Brachiaria brizantha* and *B. humidicola* under shade. **Pesquisa. Agropecuária. Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2335-2341, 2000.
- DIAS FILHO, M.B. Photosynthetic light response of the C4 grasses *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria humidicola* under shade. **Scientia. Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 65-68, 2002.
- DICKISON, W.C. **Integrative plant anatomy**. San Diego: Academic Press. 2000. 533p.
- ELLIS, R.P. A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. I. The leaf-blade as viewed in transverse section. **Bothalia**, v.12, n.1, p. 65-109, 1976.
- FUZETO, A.P.; LOMÔNACO, C. Potencial plástico de *Cabralea canjerana* subsp. *polytricha* (Adr. Juss.) Penn. (Meliaceae) e seu papel na formação de ecótipos em área de cerrado e vereda. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, n.2, p.169-176, 2000.

GIVNISH, T. J. Adaptation to sun and shade: A whole-plant perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.15, p. 63-92, 1988.

GRATANI, L.; COVONE, F.; LARCHER, W. Leaf plasticity in response to light of three evergreen species of the Mediterranean maquis. **Trees**, v.20, n.5, p.549-558, 2006.

GOBBI, K.F. Características morfoanatômicas, nutricionais e produtividade de forrageiras tropicas submetidas ao sombreamento. 2007. 82p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

JUNG, H.G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Agronomy Journal**, v.81, n.1, p.33-38, 1989.

KRAUS, J.E. ; ARDUIM, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica, EDUR. Rio de Janeiro, 1997, 198p.

LEE, D.W. et al. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v.87, n.4, p.447-455, 2000.

MARTINS, J.R. et al. Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**. v.39, n.1, p.82-87, 2009

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**, v.34, n. 2, p.145-153, 2007.

MORAIS, H. et al. Modifications on Leaf Anatomy of *Coffea arabica* caused by Shade of Pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n. 6, p. 863-871, 2004.

NAPP-ZINN, K. **Anatomic der blattes**. Berlin: Gerbrudes Borntraeger, v. 2, 1988. 1431 p.

NERY, F.C. et al. Aspectos Anatômicos de Folhas de Plantas Jovens de *Calophyllum brasiliense* Cambess. Submetidas a Diferentes Níveis de Sombreamento. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl 2, p. 129-131, 2007.

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.

PACIULLO, D.S.C. et al. Correlações entre componentes anatômicos, químicos e digestibilidade *in vitro* da matéria seca de gramíneas forrageiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**. vol.30, n.3, suppl.1, p. 955-963, 2001.

PANDEY, S.; KUSHWAHA, R. Leaf anatomy and photosynthetic acclimation in *Valeriana jatamansi* L. Grow under high and low irradiance. **Photosynthetica**, v. 43, n.1, p.85-90, 2005.

PINTO, J.E. et al . Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-Brasil em função de níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 210-214, 2007.

RESENDE, M.D.V. ; DUARTE, J.B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.3, p.182-194, 2007.

SMITH, W. K.; BILL, D. T.; SHEPHERD, K. A. Associations between leaf structure, orientation and sunlight exposure in five western Australian communities. **American Journal of Botany**. v. 85, n. 1, p. 56-63, 1998.

STEARNS, A.D. The evolutionary significance of phenotypic plasticity. **Bioscience**, v.39, n.7, p. 436-445, 1989.

SCHEINER, S.M. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 35-68, 1993.

SULTAN, S. E. Promising direct in plant phenotypic plasticity. **Perspective in plant Ecology, Evolution and Systematic**, Zurich, v. 6, n.4, p. 227-233, 2004.

VASELLATI, V.; OESTERHELDS, M.; MEDAN, D.; LORETI, J. Effects of flooding and drought on the Anatomy of *Paspalum dilatatum*. **Annals of Botany**, London, v. 88, n.3, p. 355-360, 2001.

VIA, S.; R. LANDE. Genotype-environment interactions and the evolution of phenotypic plasticity. **Evolution**, v.39, n.3, p.505-522, 1985.

VIEIRA, R. C. Contribuição ao conhecimento da anatomia ecológica de *Bauhinia radiata* Vell. Dissertação de Mestrado ( Mestrado em ciências biológicas), 203 p. 1990 - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1990.

VIEIRA, R. C.; MACHADO, R. D. Superfície foliar de *Bauhinia radiata* Vell em dois ambientes. **Hoehnea**, v. 1, n.1, p. 111-116, 1992.

VIEIRA, R. C. Anatomia da folha de *Bauhinia radiata* Vell. em diferentes ambientes. **Arquives of Biology and Tecnology**. v. 3, n. 1, p. 63-107, 1995.

VOGELMANN, T. C.; NISHIO, J. N.; SMITH, W. K. Leaves and light capture: Light propagation and gradients of carbon fixation within leaves. **Trends in Plant Science**. v.1, n.2, p. 65-70,1996.

VOLTAN, R.B.Q.; FAHL, J.I.; CARELLI, M.L.C. Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas. Revista **Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.4, n.2, p.99-105, 1992.

WHATLEY, J. M.; WHATLEY, F. R. **A luz e a vida das plantas**. São Paulo: EPU. 1982. 101p.

WILKINS, R.J. The potential digestibility of cellulose in grasses and its relationship with chemical and anatomical parameters. **Journal of Agricultural Science**, v.78, n.3, p.457- 464, 1972.



**APENDICE A** – Médias da espessura das faces das epidermes abaxial -  $\mu\text{m}$ , (EBA) e adaxial -  $\mu\text{m}$  (ADA), espessura do mesofilo -  $\mu\text{m}$  (EM), distância entre feixes -  $\mu\text{m}$  (DF), diâmetro do xilema (DX), número de feixes (NF) e células buliformes (NCB), área do tecido esclerenquimático -  $\mu\text{m}^2$  (AES) e área de células buliformes -  $\mu\text{m}^2$  (ACB) nas épocas de cultivo das águas e da seca para os 38 genótipos de *B. ruziziensis* avaliados, em 2009.

Genótipo	1		2		3		4		6		7	
Época	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca
EBA	6.51	6.24	8.30	6.59	6.12	5.60	5.93	6.87	6.16	6.62	7.14	8.25
EDA	5.83	6.43	7.56	6.23	5.50	5.08	5.67	6.19	5.50	6.10	6.80	7.38
MÊS	143.76	143.70	134.56	145.56	140.49	138.79	147.45	188.21	133.08	164.35	155.01	157.34
DX	25.54	22.32	27.34	23.46	29.99	18.33	28.03	19.53	29.03	25.87	30.10	23.48
DF	25.57	28.55	31.15	31.39	23.68	25.01	25.47	24.90	26.08	23.95	22.37	33.28
NF	5.06	5.00	4.89	4.56	5.17	5.00	5.17	4.61	5.39	4.83	5.11	4.78
NCB	4.94	4.67	4.78	4.61	5.17	5.11	5.22	4.78	5.00	4.83	4.89	4.44
AES	3645.41	3333.80	2763.56	4201.29	5195.90	3466.10	4434.59	3413.25	4481.71	3890.93	4248.02	3148.42
ACB	3578.64	3728.88	3832.28	4202.70	3670.03	3249.55	3679.56	5978.58	3498.35	4838.11	4079.27	4276.05
Genótipo	8		13		14		15		21		23	
Época	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca
EBA	7.08	7.99	6.64	6.49	6.07	6.21	6.27	5.81	6.95	6.23	6.22	7.18
EDA	6.84	7.30	6.47	6.54	5.67	5.53	6.04	5.29	6.40	6.26	5.75	6.05
MÊS	165.47	174.69	156.17	150.79	141.66	166.59	119.18	162.51	152.64	171.18	123.44	134.89
DX	33.27	24.17	29.51	25.81	25.11	22.02	28.04	20.33	30.69	28.97	28.13	20.99
DF	23.04	21.77	26.19	19.43	20.18	31.03	25.61	29.37	24.84	24.90	19.98	21.64
NF	5.00	4.67	4.94	4.83	5.00	4.78	5.39	4.39	5.17	5.11	5.44	5.22

APENDICE A, continuação

NCB	4.50	4.22	4.89	5.00	4.78	4.67	5.28	4.44	5.22	4.72	5.33	5.17
AES	5502.66	4073.08	5201.01	4074.11	2805.50	3578.13	3758.77	3233.46	3649.80	3581.26	3725.89	2981.99
ACB	4827.87	5060.95	3884.28	3757.59	3553.31	4082.54	2959.25	4153.67	3536.52	4746.42	2730.14	3651.74
Genotipo	27		29		33		35		40		41	
Época	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca
EBA	8.21	4.96	5.94	7.13	5.96	6.05	5.83	5.45	7.62	6.44	6.82	6.50
EDA	8.09	5.10	6.08	6.84	6.11	6.23	5.74	5.32	6.73	6.26	6.08	6.05
MÊS	134.85	118.63	139.91	176.46	132.16	153.52	120.98	168.60	140.93	175.31	139.31	165.52
DX	29.33	15.69	24.43	20.02	24.09	20.20	27.40	20.10	30.36	19.83	32.22	26.82
DF	25.32	21.90	22.31	31.37	23.70	21.93	20.39	23.69	23.23	25.52	20.61	19.14
NF	4.67	5.44	5.11	4.83	5.28	4.94	5.11	4.67	5.22	4.56	5.50	5.11
NCB	4.50	5.33	5.00	4.72	5.39	5.06	4.94	4.72	5.11	4.50	5.17	4.72
AES	4235.58	2676.55	4045.73	3848.98	3415.21	2865.04	2482.49	2691.35	3816.96	3585.73	5490.66	3612.61
ACB	3798.81	2870.30	3654.74	5536.09	3253.26	4240.54	3064.43	5671.27	3957.60	5400.48	3153.08	3550.41
Genotipo	43		44		48		51		53		54	
Época	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca
EBA	7.01	7.18	6.26	5.89	5.59	6.65	5.04	5.39	7.80	6.26	6.61	5.32
EDA	5.97	5.93	5.92	5.47	5.48	5.79	4.85	5.19	6.77	5.87	6.75	5.31
MÊS	156.51	156.98	152.68	189.54	120.23	143.48	147.83	151.68	126.04	136.13	145.98	141.98
DX	29.92	24.06	37.27	24.78	21.60	16.64	26.92	20.69	32.01	25.19	29.64	26.12
DF	27.12	31.43	27.59	24.85	27.68	27.81	24.64	22.87	31.82	39.31	22.26	26.02
NF	4.83	4.50	4.67	4.44	5.61	4.89	5.00	5.22	5.50	4.78	5.06	4.94

APENDICE A, continuação

NCB	4.78	4.22	4.39	4.17	5.67	5.11	5.11	4.89	5.39	4.39	4.67	4.83
AES	4485.48	3175.50	7909.76	3094.45	3398.76	2711.19	5034.56	2764.27	4388.30	4907.59	3490.90	4104.41
ACB	3926.84	4635.03	3179.65	4554.39	2935.20	4102.92	3403.50	4869.71	2900.88	3379.28	4150.52	4246.13
Genotipo	56	58		64		66		70		71		
Época	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca
EBA	6.16	6.02	6.85	6.40	7.79	5.51	6.91	6.10	6.54	6.27	5.39	7.06
EDA	6.07	6.11	6.03	5.73	6.33	5.40	6.17	6.03	5.87	5.05	5.63	6.28
MÊS	134.15	159.25	165.43	180.30	156.72	157.92	147.81	151.91	145.48	156.27	139.66	137.68
DX	29.43	21.62	31.07	24.57	32.96	22.49	23.88	17.90	30.82	25.88	30.27	21.20
DF	21.17	21.02	25.33	26.18	24.74	25.23	30.99	27.61	22.78	31.00	18.42	18.81
NF	5.11	4.89	4.50	4.61	5.44	5.28	5.33	5.00	5.39	4.83	5.06	5.22
NCB	4.89	5.06	4.56	4.50	5.06	5.11	5.06	5.17	5.39	4.39	5.06	5.11
AES	3845.03	3598.39	6084.53	4302.56	6161.48	2852.56	4668.86	2778.06	4064.76	3794.97	5447.54	4036.47
ACB	3730.53	4579.59	3895.63	4726.08	3658.80	4806.24	3781.76	3765.31	3384.69	3617.55	3386.48	3005.82
Genotipo	77	83		90		93		96		97		
Época	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca	água	seca
EBA	6.77	6.75	6.20	6.29	5.99	6.54	5.50	5.97	6.28	7.20	8.28	6.99
EDA	6.05	6.22	5.38	5.34	5.06	5.83	5.38	5.44	5.91	6.36	7.61	6.14
MÊS	136.67	139.05	142.26	164.50	131.28	159.79	111.85	149.22	152.26	171.54	139.06	178.04
DX	28.54	21.10	29.43	22.15	31.24	22.27	23.94	14.79	27.48	24.99	25.31	23.01
DF	21.73	19.16	22.75	23.71	24.17	22.32	19.91	24.32	21.88	25.19	22.27	18.85
NF	5.28	4.83	5.28	4.83	5.50	4.72	5.61	5.33	5.22	4.56	5.00	5.22

APENDICE A, continuação

NCB	5.06	5.00	5.28	4.94	5.22	4.61	5.67	4.67	5.22	4.56	4.89	5.06
AES	3778.92	2299.76	4480.50	2960.28	4352.46	3483.62	2847.70	2892.62	4682.25	4763.98	3389.26	4163.91
ACB	3514.61	3682.04	3221.91	4006.67	3190.44	4964.62	2843.65	4262.40	3012.74	3721.25	4430.10	4365.58
Genotipo	99		100									
Época	água	seca	água	seca								
EBA	6.15	5.35	5.85	6.34								
EDA	5.12	4.85	5.20	5.79								
MÊS	164.11	153.19	156.15	168.52								
DX	31.12	17.36	29.76	24.69								
DF	23.57	20.34	20.72	21.70								
NF	5.11	5.22	4.89	4.56								
NCB	4.94	5.33	4.94	4.61								
AES	4932.22	2673.31	4778.21	2997.23								
ACB	3795.25	3465.51	3238.06	3928.53								

## ARTIGO 2

### INTER-RELAÇÕES ENTRE ANATOMIA FOLIAR E VALOR NUTRITIVO DE GENÓTIPOS DE *Brachiaria ruziziensis* NA ÉPOCA DAS ÁGUAS E DA SECA

#### Resumo

Recentemente as relações entre anatomia e valor nutritivo da forragem vem sendo amplamente estudadas para dar subsídio aos programas de melhoramento na otimização de tempo e custos na seleção de genótipos. O objetivo do trabalho foi correlacionar os dados anatômicos com o valor nutritivo da forragem de 34 genótipos de *Brachiaria ruziziensis* coletadas em duas épocas do ano (época das águas e da seca). Amostras foliares na parte mediana de folhas completamente expandidas foram utilizadas para realização das análises anatômicas, conforme procedimentos usuais. Os dados de qualidade e de digestibilidade foram fornecidos pela Embrapa Gado de Leite. Para os 34 genótipos de *B. ruziziensis* avaliados, verificou-se que existem correlações entre os componentes químicos da parede celular com a digestibilidade. Entretanto, não foram observadas correlações significativas entre as características anatômicas com a digestibilidade. Na época da seca, a relação entre as características anatômicas e os componentes químicos foi baixa ( $p < 0,05$ ) e evidente para epiderme abaxial e espessura do mesofilo com a celulose, e espessura do mesofilo com fibra em detergente neutro. Nas águas somente foi observada relação ( $p < 0,05$ ) baixa e negativa (-0,34) entre proteína bruta e distância entre os feixes. Nas duas épocas de cultivo, correlações altas e positivas ( $p < 0,05$ ) foram observadas entre digestibilidade *in vitro* da matéria seca, proteína bruta e celulose. Entre a digestibilidade *in vitro* e as fibras FDA, FDN e lignina, a correlação foi alta e negativa também para ambas as épocas.

**Palavras-chave:** digestibilidade *in vitro* da matéria seca, componentes anatômicos, componentes químicos, forragem

### **Abstract**

Recently the relationship between anatomy and nutritional value of forage has been widely studied to give support to breeding programs in the optimization of time and cost in the selection of genotypes. The objective was to correlate the anatomical data with the forage nutritive value of 34 genotypes of *Brachiaria ruziziensis* collected in two seasons (rainy season and drought). Leaf samples in the middle part of fully expanded leaves were used for anatomical analysis performance, as usual procedures. Data quality and digestibility were supplied by Embrapa Dairy Cattle. For the 34 genotypes of *B. ruziziensis* evaluated, it was found that there are correlations between the chemical components of cell wall and digestibility. However, there were significant correlations between the anatomical features with digestibility. In the dry season, the relationship between the anatomical and chemical components was low ( $p < 0.05$ ) and evident for lower epidermis and mesophyll thickness to the pulp and thickness of mesophyll with neutral detergent fiber. Waters only relationship was observed ( $p < 0.05$ ) low and negative (-0.34) between protein and distance between the beams. In two seasons, high and positive correlations ( $p < 0.05$ ) were observed between *in vitro* digestibility of dry matter, crude protein and cellulose. The correlation was also high and negative for both periods between the *in vitro* dry matter digestibility, neutral detergent fiber, acid detergent fiber and lignin.

**Keywords:** *in vitro* dry matter digestibility, anatomical traits, quimical traits, forage.

## 1. Introdução

O conhecimento do valor qualitativo das forrageiras é de grande importância para subsidiar programas de melhoramento de plantas forrageiras que desejam obter um resultado relevante no complexo solo-planta-animal com base na adequada alimentação animal. De modo geral, a qualidade de qualquer alimento é dada pelo seu valor nutritivo, representado pela sua composição química, pela digestibilidade dos seus constituintes, pelo consumo voluntário e pelo desempenho animal (CRAMPTON et al., 1960; VAN SOEST, 1994).

Estudos multidisciplinares tem demonstrado a associação das características anatômicas e da composição química com a qualidade forrageira (ALVES DE BRITO, 1997; ALVES DE BRITO et al., 1999; ALVES DE BRITO, 2004; PACIULLO 2001; 2002 ; RODELLA et al., 1982). Também existem avaliações da influência da estrutura anatômica e da composição química na digestibilidade da forragem (AKIN et al., 1973, AKIN; BURDICK, 1975; CHESSON et al., 1986; HANNA et al., 1973, JUNG ; ALLEN, 1995; JUNG et al., 1997; QUEIROZ et al.,2000; TWIDWELL et al., 1991; WILSON et al., 1991).

Vários autores enfatizam a complexidade do estudo da digestibilidade envolvendo fatores como idade, posição do perfilho, tipo de tecido, variações climáticas, entre outros (PACIULLO et al.,2002; QUEIROZ et al., 2000). Segundo Macandam et al. (1996), a estação do ano influencia na digestibilidade, sendo que normalmente são observados altos valores de digestibilidade nas estações frias comparadas com as quentes.

Tecidos lignificados com parede secundária espessa tais como o esclerênquima e o xilema são pouco digeridos, apresentando correlação negativa com a digestibilidade e positiva com componentes da parede celular, contribuindo para baixa qualidade da forrageira. A maioria dos tecidos que

constituem o mesofilo e o floema tem uma correlação positiva com a digestibilidade por não apresentarem parede celular espessa e lignificada, sendo, portanto, digeridos rapidamente. Além destes, existem os tecidos com digestão parcial e lenta, como a epiderme e bainha parenquimática dos feixes (AKIN et al., 1973;1989; BRITO et al., 1999). Tratando-se da composição química, os constituintes fibrosos, como as fibras em detergente ácido e neutro e a lignina, correlacionam-se negativamente com a digestibilidade, enquanto que a proteína bruta apresenta correlação positiva (QUEIROZ et al., 2000; WILSON et al., 1983).

O estudo anatômico de lâminas foliares de gramíneas forrageiras tem auxiliado na compreensão das diferenças qualitativas entre essas plantas, que algumas vezes não são detectáveis em análises químicas (LEMPP et al., 2002), sendo possível classificar os fatores de antiqualidade por meio da anatomia e da histoquímica vegetal. Além disso, normalmente essas análises são mais rápidas e de menor custo, quando comparadas às análises das características bromatológicas da forragem. Esse fato permite a avaliação de maior número de materiais em um período mais curto de tempo, com redução de custos, contribuindo para maior agilidade na geração de informações para uso nos programas de melhoramento genético.

Este trabalho objetivou correlacionar características da anatomia foliar com o valor nutritivo da forragem de genótipos de *Brachiaria ruziziensis* nas estações das águas e da seca.

## **2. Material e Métodos**

Foram avaliados 34 clones de *Brachiaria ruziziensis* oriundos do programa de melhoramento desta espécie, desenvolvido pela Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora-MG, em parceria com a Universidade Federal de Lavras–



UFLA, Lavras, MG. Esses materiais foram cultivados no Campo Experimental de Coronel Pacheco (MG), pertencente à Embrapa Gado de Leite.

Os dados climáticos cujos valores médios estão apresentados na Tabela 1, foram obtidos na Estação Meteorológica localizada no Campo Experimental de Coronel Pacheco (MG).

**Tabela 1** – Variáveis climáticas médias observadas no período experimental. Dados fornecidos pela Estação Climatológica do Campo Experimental de Coronel Pacheco (MG), pertencente à Embrapa Gado de Leite.

Meses/ Ano	Umidade				
	Relativa (%)	Temperatura °C	Insolação (hora/dia)	Luminosidade (watt/m <sup>2</sup> )	Precipitação (mm/Mês)
jan/09	92,50	24,08	183,75	621,25	9,50
fev/09	89,61	24,15	207,68	642,14	4,21
mar/09	88,00	24,69	215,75	645,00	2,65
abr/09	87,67	20,20	214,67	621,67	0,07
mai/09	91,29	19,18	149,94	578,71	0,12
jun/09	90,13	17,22	153,77	553,33	1,25
jul/09	88,97	18,92	158,23	561,13	0,10
ago/09	86,16	18,64	164,90	589,19	0,14
set/09	84,33	22,08	192,63	609,83	3,78
out/09	89,26	22,23	159,21	600,00	3,05

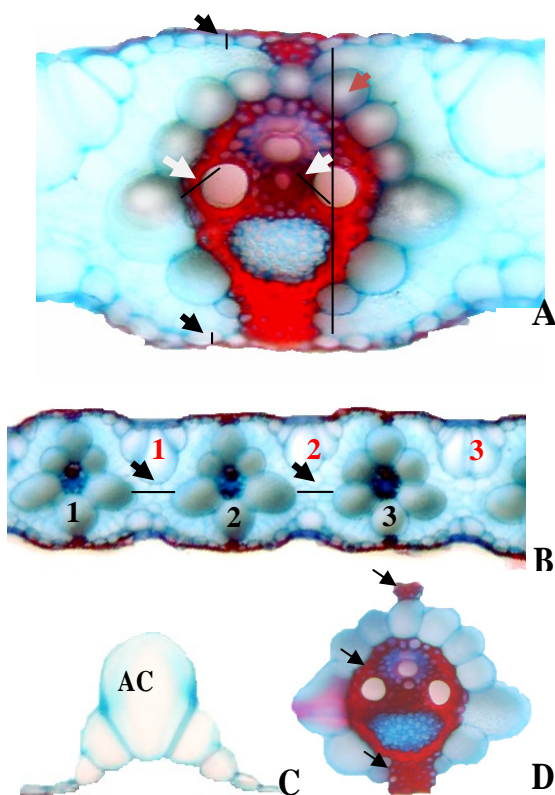
Foram realizadas coletas de amostras de forragem de cada um dos materiais genéticos em duas épocas do ano de 2009, sendo uma realizada em 12 de março (maturidade de 44 dias), representativa da estação das águas (outubro a março) e a outra realizada em 31 de agosto (maturidade de 126 dias), representativa da estação da seca (abril a setembro). As datas mais próximas de realização dos cortes de avaliação do potencial produtivo e da qualidade da

forragem foram 16/03/2009 (maturidade de 48 dias) e 19/10/2009 (maturidade de 175 dias). No total foram realizados oito cortes de avaliação.

Foram coletadas três lâminas foliares completamente expandidas localizadas na segunda gema do perfilho, da parte aérea para basal, de cada genótipo. Estas folhas foram fixadas em F.A.A<sub>70</sub> (formaldeído: ácido acético glacial: álcool etílico) por 72 horas (KRAUS; ARDUIM, 1997) e, posteriormente, preservadas em etanol 70% até a data das análises. Utilizou-se micrótomo de mesa modelo LPC para obtenção de secções transversais do terço médio foliar. As secções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50%, sendo, em seguida, lavadas em água destilada, neutralizadas em água acética 1%, coradas com azul de astra-safranina (KRAUS ; ARDUIN, 1997) e montadas em glicerina 50%.

Nas secções transversais das lâminas foliares, a partir de imagens capturadas por uma câmera acoplada a um microscópio, foram avaliadas as seguintes características: espessura do mesofilo (EM), espessura da epiderme abaxial (EBA) e adaxial (EDA), diâmetro do xilema (DX), distância entre os feixes vasculares (DF), número de feixes (NF), número de células buliformes (NCB), área das células buliformes (ACB), área do tecido esclerenquimático (AES).

As medições foram realizadas em uma área selecionada entre o primeiro e o segundo feixes maiores tendo o feixe central como referência em todos os genótipos (Figura 1). O número de repetições das observações do campo para cada folha variou para cada característica analisada. As fotomicrografias foram analisadas com o software para análise de imagens UTHSCA-Image tool<sup>®</sup>, perfazendo um total de nove repetições por folha. Para as demais características, foram também observados duas regiões distintas de cada campo, totalizando em seis repetições.



**Figura 1** - Fotomicrografias esquemáticas representando a padronização das medições A) As setas representam as medições das espessura das epidermes abaxial e adaxial (EBA e EDA) (preta), EM (vermelha) e diâmetro do xilema (DX) (branca). B) As setas e o número (preto) indicam as medições do distancia entre feixes (DF) e número de feixes (NF), respectivamente; o número (vermelho) indica o número de células buliformes (NCB). C) Área das células buliformes (ACB). D) Área do tecido esclerenquimático representada em vermelho escuro AES.

De cada uma das três parcelas contendo 34 genótipos foram retiradas duas amostras de perfilhos sendo uma utilizada para a obtenção da porcentagem de matéria seca da planta inteira e a outra, separada em caule e folha, para

estabelecimento da relação entre folhas e caules (RFC). Após a secagem destas porções (folha, caule e planta inteira), procedeu-se a moagem, a 1mm, para realização das análises bromatológicas das frações da planta (caule e folha). As estimativas das porcentagens de proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL), lignina (LIG) e digestibilidade de matéria seca (DMS) foram obtidas em equipamento NIR's (espectroscopia do infravermelho próximo) no laboratório de análise de forragem da Embrapa Gado de Leite.

Os dados anatômicos foram submetidos à análise de variância individual (por época), considerando um delineamento inteiramente casualizado. Realizou-se também à análise conjunta de acordo com o seguinte modelo estatístico:

O modelo estatístico adotado foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + g_i + e_j + ge_{ij} + f_{k(ij)} + c_{l(ijk)};$$

$Y_{ijk}$  = é a observação do genótipo i, na época j, na folha k, no corte l;

$\mu$  = é a média geral;

$g_i$  = é o efeito fixo do genótipo i;

$e_j$  = é o efeito fixo da época j;

$ge_{ij}$  = é o efeito fixo da interação do genótipo i com a época j;

$f_{k(ij)}$  = é o efeito da folha k dentro da interação genótipo\*época;

$c_{l(ijk)}$  = é o efeito do corte l dentro da folha k dentro da interação genótipo com a época.

Para as comparações entre médias de genótipos utilizou-se o teste de agrupamento Scott-Knott com probabilidade de 5%.

Correlações lineares de Pearson foram realizadas entre os dados qualitativos, anatômicos e de digestibilidade.

As análises de variância foram feitas com o auxílio do software SISVAR, exceto para as correlações lineares em que foi utilizado o SAS.

A qualidade experimental foi aferida pela estimação do parâmetro acurácia seletiva (RESENDE; DUARTE, 2007)

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Características anatômicas e digestibilidade**

A precisão experimental baseada na acurácia seletiva em valores de F para efeito dos genótipos foi classificada, segundo Resende e Duarte (2007), como baixa para FDA (34,05%) e Celulose (36,41%), moderada para Lignina (64,16%) e de alta magnitude para DIVMS (71,66%) e PB (81,22%). Para os dados anatômicos, a acurácia pode ser considerada alta ou muito alta, variando de 76,66% para NF à 90,07% para DF (Figura 2B).

Na análise de variância, todas as fontes de variação para todos os componentes anatômicos avaliados apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), evidenciando a existência de variabilidade genética entre genótipos, entre épocas e interação genótipos com as épocas (Tabelas 4 e 5). Na análise considerando o efeito entre épocas, as características EM, DF e ACB (Figura 2 A, B e D) apresentaram maiores médias na época das águas. Já as mensurações de EDA, EBA, NF, NCB, AES (Figura 2 A; B e C) apresentaram maiores médias na seca (Tabela 5).

Para cada face da epiderme, os genótipos foram separados em três grupos (APENDICE A). Os genótipos classificados com maior média para EDA (Figura 2A) foram 2, 8, 27, 71 e 97, com a média desses genótipos de 6,90  $\mu\text{m}$ . Exceto para o genótipo 27, os demais apresentaram o mesmo comportamento para EBA (Figura 2A) (APENDICE A).

Em gramíneas C4 a epiderme é classificada como tecido de digestão lenta e parcial de acordo com Akin (1989), além de ser a maior rota de invasão, via lesão, dos microorganismos que colonizam as partículas no rúmex do animal. Paciullo (2002) observou em três gramíneas forrageiras que a epiderme apresentou digestão parcial em todas elas. Ou seja, um dos fatores que ajudam na digestibilidade é a espessura da epiderme, de modo que quanto menor a sua espessura da epiderme mais facilmente será digerida e lesionada permitindo maior acessibilidade dos microorganismos ao conteúdo celular dentro do rúmex do animal., Isso sem levar em consideração os componentes químicos que também afetam a digestibilidade.

Para EM (Figura 2 A), os genótipos foram divididos em dois grupos ( $p < 0,05$ ) considerando ambas as épocas (“úguas” e “seca”): grupo 1, contendo 14 genótipos, com a média  $137,85\mu\text{m}$  e grupo 2 contendo 20 genótipos com a média  $157,92\mu\text{m}$ . Células do mesófilo e do floema que possuem parede delgada primária e não lignificada (AKIN et al., 1973; HANNA et al., 1973). são rápida e totalmente digeríveis devido a facilidade de fragmentação em pequenas partículas pela biota ruminal. De acordo com Wilson e Mertens (1995), a biota ruminal tem facilidade de acessar 180 vezes mais tecidos do mesófilo comparados com o esclerênquima e o xilema devido a área superficial de colonização com o volume de espessamento da parede a ser digerida.

Para a AES (Figura 2C), os genótipos foram divididos em dois grupos ( $p < 0,05$ ), o primeiro constituído pelos genótipos 3, 6, 8, 13, 41, 44, 53, 58, 64 e o 96 (média de  $4706,81\mu\text{m}^2$ ) superando os demais que foram incluídos no segundo grupo (APENDICE A). Esses tecidos em razão da lignificação e da difícil acessibilidade dos microorganismos resultam em partículas de tamanho grande e pouco digeríveis (WILSON; MERTENS, 1995). Rodella (1982), Akin (1989) e Chesson et al. (1986) afirmaram que maiores proporções de tecidos lignificados e esclerenquimáticos proporcionam menores taxa de digestibilidade.

Considerando a variável DX (Figura 2B), formaram-se três agrupamentos (grupo 1= 20,38 $\mu$ m, grupo 2= 24,26 $\mu$ m e grupo 3 = 27,97  $\mu$ m) (APENDICE A). DX e AES (Figura 2B e C) correspondem ao xilema e às porções lignificadas com esclerênquima e, portanto, são indigeríveis, pois possuem paredes secundárias espessadas e, em geral, apresentam correlação positiva com teores de fibra e lignina e negativa com digestibilidade, (AKIN et al., 1973,1989; BRITO et al., 1999; CHESSON et al., 1986; PACIULLO et al., 2001). As maiores médias obtidas nas águas pode estar relacionada às altas temperaturas (Tabela 1) que resultam em aumento na lignificação da parede celular (Van Soest, 1994), e isto pode comprometer a digestibilidade.

Em relação ao NF (Figura 2B), os genótipos que se destacaram com médias inferiores (4,79 e  $p < 0,05$ ) foram 2, 7, 8, 13, 14, 15, 35, 40, 43, 44, 58, 96 e 100. Para DF, o genótipo 53 apresentou maior média (APENDICE A) seguido do genótipo 2 e de dois outros grupos com média de 27,73 $\mu$ m e de 22,97 $\mu$ m, em ordem decrescente

Os feixes vasculares em gramíneas apresentam disposição paralela o que confere grande resistência física ao limbo. Um maior número deles associado com a menor distância dificulta a ruptura dessas frações quando consumidas pelos animais, resistindo assim à digestão. Segundo Lechner-Doll et al., (1991) as partículas grandes no rúmen do animais tem uma maior contribuição devido os feixes vasculares e o esclerênquima que juntamente com a epiderme, mantêm a integridade da folha ou do caule. Os feixes junto com esclerênquima, apresentam grupo de células de parede espessa, são também responsáveis pela ligação da epiderme com restante dos tecidos, apresentando maior resistência a danos físicos e químicos, impedindo desprendimento da epiderme com a folha. Essa estrutura que limita digestibilidade e chamada de girder I, pois possui em ambas faces. (Wilson et al., 1989).

**Tabela 4** – Resumo da análise de variância conjunta por época (águas e seca) para espessura das epidermes adaxial, (EDA,  $\mu\text{m}$ ) e abaxial (EBA-  $\mu\text{m}$ ), diâmetro do xilema (DX-  $\mu\text{m}$ ) e espessura do mesofilo (EM-  $\mu\text{m}$ ) de genótipos de *Brachiaria ruziziensis*, conforme a época: água e seca.

FV	GL	EDA		EBA		DX		EM	
		QM	P	QM	P	QM	P	QM	P
G	33	1.75	<0.05	2.07	<0.05	48.32	<0.05	881.12	<0.05
E	1	3.41	<0.05	5.36	<0.05	2229.62	<0.05	11320.87	<0.05
G*E	33	0.85	<0.05	1.42	<0.05	15.76	<0.05	390.04	<0.05
Erro	136	0.36		0.51		9.52		239.28	



**Tabela 4** – Resumo da análise de variância conjunta por época (águas e seca) para espessura das epidermes abaxial, distância entre feixes (DF-  $\mu\text{m}$ ), número de feixes (NF) e células buliformes (NCB), área de tecido esclerenquimático (AES-  $\mu\text{m}^2$ ) e área de células buliformes (ACB-  $\mu\text{m}^2$ ) de genótipos de *Brachiaria ruziziensis*, conforme a época: água e seca.

FV	GL	DF		NF		NCB		AES		ACB	
		QM	P	QM	P	QM	P	QM	P	QM	P
G	33	69.76	<0.05	0.28	<0.05	0.36	<0.05	2625456.54	<0.05	1118244.54	<0.05
E	1	64.48	<0.05	3.83	<0.05	3.28	<0.05	42429104.29	<0.05	20993370.15	<0.05
G*E	33	24.85	<0.05	0.16	<0.05	0.24	<0.05	2360097.03	<0.05	718638.45	<0.05
Erro	136	13.15		0.12		0.12		1043591.76		380194.14	

**Tabela 5** – Médias da ANAVA para espessura das epidermes abaxial, (EBA,  $\mu\text{m}$ ) e adaxial (EDA-  $\mu\text{m}$ ), espessura do mesofilo (EM-  $\mu\text{m}$ ), distância entre feixes (DF-  $\mu\text{m}$ ), número de feixes (NF) e células buliformes (NCB), área de tecido esclerenquimático (AES-  $\mu\text{m}^2$ ) e área de células buliformes (ACB -  $\mu\text{m}^2$ ) de genótipos de *Brachiaria ruziziensis*, conforme a época: água e seca.

Época	EBA	EDA	EM	DX	DF	NF	NCB	AES	ACB
Seca	6.30 a	5.85 a	157.10 b	22.24 a	25.26 b	4.87 a	4.77 a	3406,73 a	4182,21 b
Água	6.63 b	6.11 b	142.20 a	28.86 b	24.14 a	5.15 b	5.02 b	4318,84 b	3540.63 a

Os resultados obtidos para número e distância entre feixes NF e DF (Figura 2B) são contraditórios, pois nem sempre a menor distância observada entre os feixes coincidiu com o maior número deles, impedindo ser uma característica comparativa de relação entre eles havendo necessidade de comparação individual. Como por exemplo, o genótipo 53 apresentou maior média para DF, mas se enquadrou no grupo (APENDICE A) com as maiores médias para NF. Para o genótipo 2 houve consistência entre o esperado e o observado, pois constatou-se uma maior distância entre os feixes associado com um número de feixes menor. O genótipo 40 apresentou a maior média de digestibilidade e foi incluído no grupo (APENDICE A) com menores médias para NF, fato que concorda com as discussões anteriores.

Para NCB (Figura 2B), o teste de Scott-Knott reuniu os genótipos em três grupos (APENDICE A), sendo que no primeiro foram incluídos os genótipos 8, 43, 44 e 58 com a média de 4,42. Os genótipos 1, 2, 7, 14, 35, 40, 54 e o 100 com média de 4,76, integraram o segundo grupo e os demais genótipos enquadraram-se no terceiro grupo, em ordem crescente de médias (5,04) (APENDICE A). Para ACB (Figura 2D), a divisão foi somente em dois grupos, cuja maior média ( $4300,59\mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,05$ ) foi observada para os genótipos 2, 6, 7, 8, 21, 35, 40, 43, 51, 54, 56, 58, 64 e 97 (APENDICE A).

As células buliformes são células epidérmicas que apresentam alta digestibilidade devido a presença de paredes celulares finas recoberta por uma fina cutícula com composição química distinta daquela que recobre as demais células epidérmicas (ALVES DE BRITO, 1997; WILSON, 1976;). Segundo Chesson et al. (1986) as paredes internas da epiderme, principalmente das células buliformes, não oferecem resistência à digestão microbiana, pois a composição de sua parede celular equivale à do mesofilo. Alves de Brito et al. (2004) afirmou que na grande maioria dos trabalhos realizados com anatomia

quantitativa, associada à degradação ruminal, o tecido parenquimático encontra-se somado à área de células buliformes, por afinidades estruturais.

Neste trabalho observou-se que o genótipo 64, classificado com maior média para o teor de lignina e no grupo de maior média para DX (Figura 2B) (APENDICE A), também foi incluído entre os genótipos com maiores médias de AES (Figura 2 C) (APENDICE A). O inverso ocorreu para o genótipo 33.

O genótipo 64 está entre os genótipos com maior média para NCB e ACB (Figura 2B e D) pelo teste de agrupamento (APENDICE A). O genótipo 40 também foi incluído no grupo de maior média de ACB quando comparado aos demais genótipos. Entretanto, ambos diferiram quanto à digestibilidade, sendo maior no genótipo 64 (APENDICE A).

O comportamento dos 34 genótipos para os dados qualitativos na análise conjunta de épocas (“águas e seca”) foi coincidente somente para celulose, FDA e FDN ( $p > 0,05$ ) (Tabela 6). Houve diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as épocas para os dados qualitativos avaliados, exceto para variável DIVMS que apresentou a maior média (62,42%) na “seca”. As demais apresentaram as maiores médias nas “águas” (Tabela 7). A interação genótipo com ambiente somente foi significativa ( $p < 0,05$ ) para teores de DIVMS e PB.

Na análise de variância conjunta, todos os 34 genótipos se comportaram de maneira diferente entre as épocas, tanto para celulose quanto para lignina, com a maior média observada no desdobramento da análise para a época das “águas” (Tabela 6 e 7). Mudanças ambientais como aumento de temperatura têm sido uma das causas do aumento de teores de lignina e estrutura dos polissacarídeos (HANDERSON; ROBINSON, 1982). As correlações superiores da celulose com a lignina observadas neste estudo na época das “águas” corroboram com esta observação, pois neste período a temperatura foi superior à época da “seca” (Tabelas 1, 3 e 4).

Na análise individual de genótipos entre as épocas , os genótipos: 1, 3, 6, 8, 14, 15, 21, 23, 27, 33, 35, 40, 41, 43, 44, 48, 51, 53, 54, 56, 58, 64, 66, 70, 77, 83, 93 , 96, 97, 99 e 100 para FDA e os genótipos 2, 3, 14, 33, 40 , 41, 43, 44, 56, 58, 66, 70, 77, 93 e o 100 para FDN obtiveram as maiores médias nas “águas” (APENDICE C). Valores de FDA mais altos ( $p < 0,01$ ) foram também observados no verão (59,9 contra 53,8% obtido no outono) por Paciullo (2001), o que pode ser atribuído aos mais elevados teores de lignina e de celulose (50,2% no verão e 45,9% no outono) observados nesta estação. Resultado coincidente foi demonstrado neste trabalho onde teores de lignina (3,41%) e celulose (32,41%) considerando a média dos 34 genótipos, foram maiores na época das águas ( $p < 0,05$ ) (Tabela 7). Além disso, não foi verificada interação do genótipo com a época ( $p > 0,05$ ) para estas características (Tabela 6) como também para Lignina.

Para a análise individual da DIVMS por época, o comportamento dos 34 genótipos foi coincidente para a época das “águas”. Na avaliação do efeito de épocas /genótipos, os genótipos 2, 6, 14, 21, 27, 33, 40, 41, 43, 51, 53, 56, 58, 64, 66, 70, 77, 83, 93, 96, 97, 99 e 100 apresentaram maiores médias na época da “seca”, sendo que os genótipos 3, 27, 48, 56, 64, 70, 93 e 100 se destacaram, no grupo com maior média (APENDICE C), em relação aos demais para esta característica .

Fatores ambientais, tais como fotoperíodo e temperatura, influenciam na digestibilidade. Em geral, mais altos valores de digestibilidade são observados durante as estações frias (outono/inverno) que durante as estações quentes (primavera/verão), sendo que a taxa de declínio na digestibilidade é mais alta na estação quente (JONHSON et al., 1973; MACADAM et al., 1996) Temperaturas elevadas comprometem a digestibilidade da matéria seca da forragem, seja de gramíneas ou leguminosas e de colmos ou folhas (WILSON, 1982; WILSON et al., 1991).

Considerando as discussões anteriores e o comportamento dos genótipos no agrupamento, é esperado que quanto maior a média da AES ou DX, menor seria a digestibilidade. Para a digestibilidade, os genótipos foram divididos em dois grupos (APENDICE B) (grupo 1 = 55,37 e grupo 2 = 60,68), e para o EM, dois grupos (grupo 1 = 137,85  $\mu\text{m}$  e grupo 2 = 157,92  $\mu\text{m}$ ) (APENDICE A). Os genótipos 64 e o 70 foram incluídos no grupo com menor média para digestibilidade, mas com maiores médias para DX e EM no teste Scott-Knott (Tabelas A e B). Diferente do esperado, o genótipo 40 foi classificado no grupo de clones com a maior média de digestibilidade e foi enquadrado no segundo grupo crescente de classificação para a variável DX (Figura 2 A e B). O genótipo 48, por sua vez, foi classificado no grupo de menores médias de digestibilidade e DX (Tabelas A e B).

Para os teores de PB, comparando efeito da época/genótipo, os genótipos 14 e 56 apresentaram diferenças ( $p < 0,05$ ) entre as épocas, com médias superiores no cultivo da “seca”, e os genótipos 1 e 7 foram superiores no cultivo das “águas” (APENDICE C). O teste Scott-Knott gerou dois agrupamentos: grupo 1 (média 7,51) e grupo 2 (média 8,51) (APENDICE B). Carvalho (1999) concluiu que na época da seca o teor de proteína de folhas sob a copa das árvores são bem mais altos que aquelas em pleno sol. Esse fato pode ser justificado também pelas temperaturas menores provocada pelo sombreamento, corroborando com os resultados observados para os genótipos 14 e 56.

No teste de agrupamento para teores de lignina, foram formados dois grupos com médias de 2,53 e 2,88. O genótipo 64 apresentou a maior média (3,29) e o genótipo 40 a menor média (2,25) (APENDICE B). Para DIVMS, na análise do comportamento dos genótipos no teste de agrupamento, 27 genótipos foram agrupados com médias, sendo o genótipo 40 (63,66) com a maior média entre aqueles do primeiro grupo comparado com o segundo grupo com a médias

de menores valores composto pelos genótipos 3, 27, 48, 56, 64, 70 e 93, sendo o 64 apresentando a menor média (57,72) (APENDICE B). O fato do genótipo 40 ter apresentado a menor média de teor de lignina e a maior de digestibilidade no teste de agrupamento (APENDICE B) corrobora com informações amplamente relatadas na literatura de que a lignina é um fator limitante da digestibilidade da parede celular (BUXTON; RUSSELL, 1988; JUNG, 1989; JUNG; VOGEL, 1986).

**Tabela 6** – Resumo da ANAVA conjunta para: celulose, digestibilidade da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), lignina e proteína bruta (PB) em genótipos de *Brachiaria ruziziensis*, nas duas estações: água e seca.

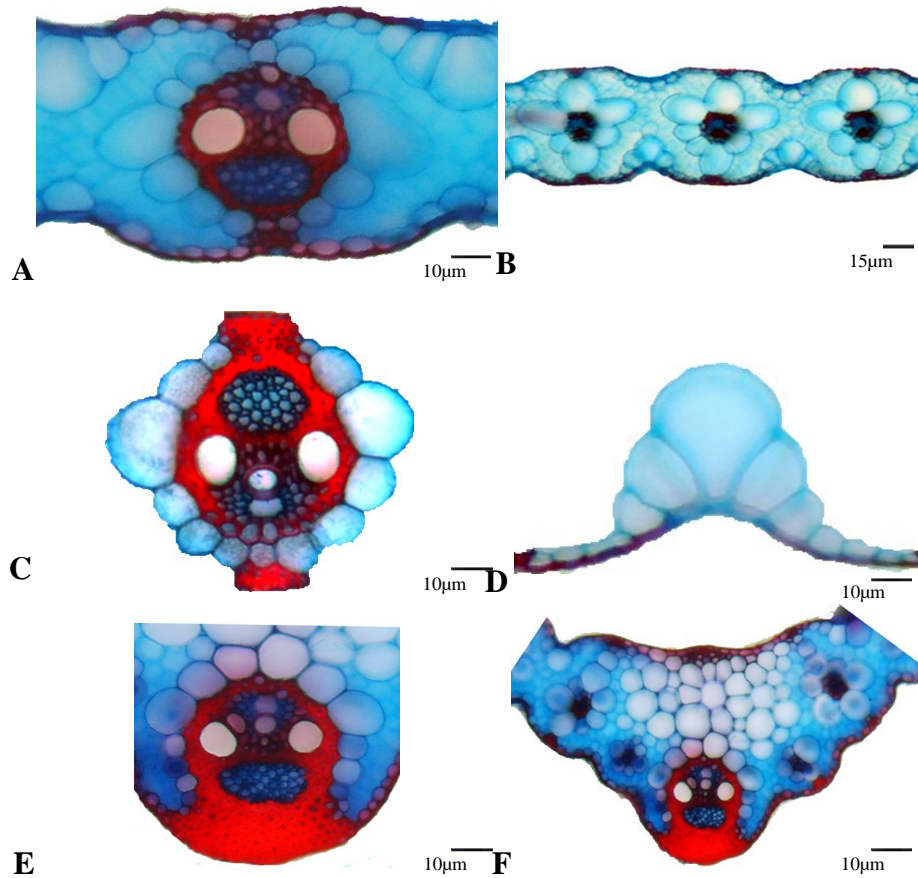
FV	GL	Celulose		DIVMS		FDN		FDA		Lignina		PB	
		QM	P	QM	P	QM	P	QM	P	QM	P	QM	P
G	33	4.57	>0.05	8.71	<0.01	5.84	>0.05	5.32	>0.05	0.29	<0.05	2.30	<0.01
E	1	2514.49	<0.01	988.06	<0.01	564.07	<0.01	2657.75	<0.01	100.62	<0.01	7.17	<0.01
G*E	33	4.28	>0.05	9.39	<0.01	6.18	>0.05	5.65	>0.05	0.16	>0.05	1.19	<0.05

G = genótipo; E = época; G\*E.

**Tabela 7** – Resultados das medias da ANAVA do comportamento individual das épocas para os teores de celulose, digestibilidade da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), lignina e proteína bruta (PB) em genótipos de *Brachiaria ruziziensis*, conforme a época: água e seca.

Época	Celulose		DIVMS		FDN		FDA		Lignina		PB	
Seca	25.39	A	62.42	A	64.91	A	31.01	A	2.00	a	7.77	a
Água	32.41	B	58.02	B	68.23	B	38.23	B	3.41	b	8.14	b

Médias seguidas de mesma letra na colunas não diferem pelo teste de F.



**Figura 2** – Fotomicrografias de secções transversais das folhas de genótipos cultivado na época das águas A) Espessura das epidermes – genótipo 7- (EBA e EDA) (Objetiva 20x), B) Número de feixes e número de células buliformes – genótipo 19 - (Objetiva 10x), C) Área do tecido esclerenquimático – genótipo 29- (Objetiva 20x) D) Área das células buliformes – genótipo 17 - (Objetiva 20x) E) Feixe central – genótipo 3 - (Objetiva de 20x) F) Feixe central- genótipo 3- (Objetiva de 20x).



### **3.2. Correlações entre as características anatômicas, química e digestibilidade**

Considerando os dados anatômicos e de qualidade, foi observada correlação baixa e negativa ( $p < 0,05$ ;  $-0,34$ ) entre PB e DF na época das águas (Tabela 8). Na época das secas, também foram observadas correlações negativas e baixas ( $p < 0,05$ ) para EM com a celulose e com a FDN, ( $-0,41$  e  $-0,36$ , respectivamente), e entre EDA com a celulose ( $-0,40$ ) (Tabela 9). Entretanto, considerando a comparação dos dados em ambas as épocas, não houve correlação entre as características anatômicas e a digestibilidade ( $p > 0,05$ ) (Tabelas 8 e 9).

Fatores como maturidade fisiológica, nível de inserção da folha nos perfilhos, frações do perfilho (caule, folha), condições ambientais (estação do ano) e composição química podem influenciar os resultados da associação entre os caracteres anatômicos e de digestibilidade (PACIULLO, 2000; PACIULLO et al., 2002; QUEIROZ et al., 2000; WILSON 1976)

Os dados anatômicos obtidos neste estudo compreendem os valores absolutos das medições. Outros estudos que apontam correlações significativas entre os componentes anatômicos e o valor nutritivo em forrageiras adotam como medidas, a proporção dos tecidos (PACIULLO et al. 2001a; 2001b; QUEIROZ et al., 2000). Mesmo que a proporção do tecido representa melhor o volume se comparada aos valores absolutos, não necessariamente há relação direta entre esta e a digestibilidade. Paciullo et al. (2001), por exemplo, correlacionando a proporção de tecidos com os componentes químicos de lâminas foliares de três gramíneas forrageiras, incluindo uma espécie de *Brachiaria*, não encontrou correlação significativa entre o mesofilo e FDN.

A celulose, um dos principais componentes da parede celular, apresentou correlação significativa ( $p < 0,05$ ) com alguns caracteres, sendo

negativa em relação à PB e positiva com os teores de fibras (FDA e FDN) e lignina (Tabelas 8 e 9). Esse comportamento foi observado nas duas épocas, sendo maior para FDA e FDN nas “águas” (0,93 e 0,84) em comparação com o período da “seca” (0,81 e 0,71). O inverso foi observado para os teores de lignina (0,88 na “seca” versus 0,67 nas “águas”) (Tabelas 8 e 9).

A relação da celulose com as fibras e com a lignina deve-se à constituição dos materiais fibrosos, que apresentam basicamente celulose, hemicelulose e lignina. Além disso, compreendem um complexo onde a celulose e a hemicelulose estão aglutinadas em um arranjo incrustado por lignina, (PINTO, 2003).

Houve correlação positiva ( $p < 0,05$ ) em ambas as épocas (Tabelas 8 e 9), para os teores de FDA e FDN com a lignina, porém com valores superiores na “seca” (Tabela 3). As fibras correlacionaram-se entre si com um índice alto e positivo, 0,80 e 0,83 ( $p < 0,05$ ) nas “águas” e na “seca”, respectivamente (Tabelas 8 e 9). Resultados semelhantes para três gramíneas forrageiras: capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*), capim gordura (*Melinis minutiflora*) e capim-bermuda Tifton 85 (*Cynodon* sp.) foram obtidos por Paciullo et al. (2001) que encontraram correlações altas entre a lignina e as fibras e negativa com a PB. Queiroz et al. (2000) avaliando composição química de três espécies de gramíneas forrageiras: capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, cv. Mott), capim-setária (*Setaria anceps*, cv. Kazungula) e capim-jaraguá (*Hyparrhenia rufa*, Nees Stapf ) observaram correlações positivas ( $p < 0,05$ ) considerando todas frações juntas ou separadas do topo, base e bainha foliar de FDA e FDN com a lignina.

A relação das fibras com a lignina influencia diretamente a digestibilidade. As fibras não são um bom indicador de digestibilidade quando os teores de lignina e os de FDA e FDN são baixos (QUEIROZ et al. 2000; VAN SOEST, 1994). Esse fato esse pode ser comprovado pela comparação das relações obtidas nas duas épocas (Tabelas 8 e 9). Na época da seca, observaram-

se correlações mais altas e positivas entre a lignina e as fibras (0,90 e 0,77), e consequentemente, maiores valores negativos entre as fibras e digestibilidade (-0,78 e -0,74), quando comparados os valores das correlações na época das águas (Tabelas 2 e 3).

A DIVMS apresentou correlações significativas ( $p < 0,01$ ) com todos os dados de composição química avaliados (celulose, FDA, FDN, lignina e PB) em ambas as épocas, sendo somente positiva com os teores de PB (Tabelas 8 e 9). Existem diversos relatos da correlação significativa entre DIVMS e teores de FDA e FDN (MOIR et al., 1975; VAN SOEST, 1965; WILSON et al., 1983; WILSON; HATTERSLEY, 1989). Na literatura observa-se que, em geral, os constituintes fibrosos (FDA, FDN e lignina) correlacionam-se negativamente com a DIVMS (PACIULLO 2001; QUEIROZ et al., 2000; WILSON et al., 1983).

Paciullo (2007) avaliando características morfofisiológicas e o valor nutritivo da *Brachiaria decumbens* em um sistema silvipastoril concluiu que o sombreamento provocado pela presença das árvores possibilita aumento dos teores de proteína bruta e redução dos de fibra em detergente neutro, e incrementa a digestibilidade *in vitro* da matéria seca de laminas foliares da *B. decumbens*, cultivada no subbosque. Neste mesmo trabalho, o autor verificou que a maior DIVMS esteve relacionada ao maior teor de PB foliar e menor de FDN, em condições de sombreamento.

Maiores concentrações de PB contribuem para o acesso de N aos microorganismos no rúmen do animal e também para criar regiões mais susceptíveis à ação dos microrganismos. Justificando essa afirmativa e corroborando com este trabalho Alves de Brito (2003) encontrou correlação alta entre PB e digestibilidade (0,89) em *Brachiaria brizantha* e *B. humidicola*. Queiroz et al. (2000) justificaram a baixa digestibilidade da fração fibrosa pelos menores teores de PB encontrados em capim Jaraguá.

**Tabela 8** - Correlações lineares (Pearson) entre as características anatômicas [EDA (espessura da epiderme adaxial -  $\mu\text{m}$ ), EBA (espessura da epiderme abaxial-  $\mu\text{m}$ ), EM (espessura do mesofilo-  $\mu\text{m}$ ), DX (diâmetro do xilema-  $\mu\text{m}$ ), DF (distância entre feixes-  $\mu\text{m}$ ), NF (número de feixes), NCB (número de células buliformes), AES (área do tecido esclerenquimático-  $\mu\text{m}^2$ ), ACB (área de células buliformes -  $\mu\text{m}^2$ )], digestibilidade (DIVMS) e componentes químicos de lâminas foliares [FDA (fibra em detergente ácido), FDN (fibra em detergente neutro), lignina, celulose, PB (proteína bruta)] de genótipos de *Brachiaria ruziziensis* (N=34 observações) na época das águas para: digestibilidade, componentes químicos e componentes anatômicos.

	Celulose	DIVMS	FDA	FDN	LIGNINA	PB	EBA	EDA	EM	DX	DF	NF	NCB	AES	ACB
Celulose	1	-0.72 ***	0.93 ***	0.84 ***	0.67 ***	-0.66 ***	0.04 0.84	-0.08 0.66	-0.01 0.97	-0.12 0.50	0.14 0.42	0.11 0.54	0.22 0.21	-0.02 0.90	-0.04 0.80
DIVMS		1.00	-0.59 ***	-0.66 ***	-0.47 **	0.58 ***	-0.02 0.93	0.16 0.36	-0.04 0.80	0.11 0.52	-0.06 0.74	-0.07 0.69	-0.14 0.43	-0.05 0.77	0.07 0.71
FDA			1.00	0.80 ***	0.52 *	-0.61 ***	0.02 0.92	-0.07 0.68	-0.04 0.81	-0.23 0.20	0.09 0.62	0.12 0.50	0.24 0.17	-0.14 0.44	-0.04 0.82
FDN				1.00	0.49 **	-0.62 ***	0.01 0.96	-0.08 0.64	-0.12 0.52	-0.19 0.28	0.01 0.93	0.06 0.72	0.17 0.34	-0.09 0.60	-0.03 0.85

Tabela 8, conclusão

Lignina	1.00	-0.10	-0.08	-0.21	0.15	0.11	0.05	0.16	0.08	0.25	0.04
		0.58	0.65	0.23	0.39	0.55	0.79	0.38	0.67	0.16	0.80
PB	1.00	-0.03	-0.01	0.28	0.22	-0.34	-0.05	-0.28	0.08	0.27	
		0.85	0.96	0.11	0.21	*	0.80	0.11	0.64	0.12	

**Tabela 9** - Correlações lineares (Pearson) entre as características anatômicas [EDA (espessura da epiderme adaxial -  $\mu\text{m}$ ), EBA (espessura da epiderme abaxial-  $\mu\text{m}$ ), EM (espessura do mesofilo-  $\mu\text{m}$ ), DX (diâmetro do xilema-  $\mu\text{m}$ ), DF (distância entre feixes-  $\mu\text{m}$ ), NF (número de feixes), NCB (número de células buliformes), AES (área do tecido esclerenquimático-  $\mu\text{m}^2$ ), ACB (área de células buliformes -  $\mu\text{m}^2$ )], digestibilidade (DIVMS) e componentes químicos de lâminas foliares [FDA (fibra em detergente ácido), FDN (fibra em detergente neutro), lignina, celulose, PB (proteína bruta)] de genótipos de *Brachiaria ruziziensis* (N=34 observações) na época das seca para: digestibilidade, componentes químicos e componentes anatômicos.

	Celulose	DIVMS	FDA	FDN	LIGNINA	PB	EBA	EDA	EM	DX	DF	NF	NCB	AES	ACB
Celulose	1.00	-0.62	0.81	0.71	0.88	-0.37	-0.07	-0.40	-0.41	-0.27	0.10	0.04	0.10	-0.22	-0.08
		**	***	***	***	*	0.68	*	*	0.12	0.56	0.83	0.59	0.20	0.65
DIVMS			-0.78	-0.84	-0.73	0.48	0.02	0.31	0.34	0.17	-0.08	-0.14	-0.10	0.14	0.17
			***	***	***	**	0.93	0.07	0.05	0.33	0.65	0.42	0.57	0.42	0.33

Tabela 9, conclusão

FDA	1.00	0.83 ***	0.90 ***	-0.31 0.07	-0.04 0.83	-0.24 0.16	-0.27 0.12	-0.18 0.30	0.26 0.14	0.02 0.91	0.00 0.98	-0.08 0.67	-0.04 0.81
FDN		1.00	0.77 ***	-0.39 *	-0.06 0.75	-0.29 0.09	-0.36 *	-0.24 0.17	0.09 0.60	0.18 0.31	0.13 0.48	-0.29 0.10	-0.17 0.33
Lignina			1.00	-0.24 0.17	-0.02 0.91	-0.18 0.31	-0.27 0.12	-0.12 0.50	0.10 0.58	0.06 0.75	0.04 0.82	-0.15 0.41	-0.06 0.72
PB				1.00	-0.03 0.85	0.31 0.08	0.28 0.11	0.10 0.56	-0.07 0.71	0.07 0.68	0.19 0.28	0.10 0.57	0.06 0.75

#### 4. Conclusão

Nos genótipos de *B. ruzizensis* avaliados, verificou-se que existem correlações entre os componentes químicos da parede celular com a digestibilidade. Entretanto, não foram observadas correlações significativas entre as características anatômicas com a digestibilidade.

Houve associação entre a espessura da epiderme abaxial e espessura do mesofilo com celulose e espessura do mesofilo com as fibras em detergente neutro e ácido na época de cultivo da seca.

Correlações positivas foram observadas entre DIVMS, PB e celulose e negativas com FDA, FDN e Lignina.

Na época das águas (outubro a março), período em que a temperatura é mais alta, observou-se que os teores de lignina e fibras, área de tecidos lignificado e diâmetro de xilema dos genótipos de *B. ruzizensis* foram superiores em relação ao observado na época da seca.

## REFERÊNCIAS

AKIN, D.E. et al. Rumen microbial degradation of grass tissue by scanning electron microscopy. **Agronomy Journal**, v.65, n.5, p.825-828, 1973.

AKIN, D.E.; BURDICK, D Percentage of tissue types in tropical and temperate grass leaf blades and degradation of tissues by rumen microorganisms. **Crop Science**, v.15, n.5, p.661-668, 1975.

ALVES DE BRITO, C. J. F.; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F. C. Perfil químico da parede celular e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, suplemento 2, n. 6, p. 1835-1844, 2003.

ALVES DE BRITO, C.J.F. **Organização estrutural e degradação in vitro de tecidos em *Pennisetum purpureum* Schum. (Poaceae)**. 1997. 119p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

ALVES DE BRITO, C. J. F.; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F. C. Anatomia Quantitativa da Folha e do Colmo de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p.519-528, 2004.

ALVES DE BRITO, C.J.F.; RODELLA, R.A.; DESCHAMPS, F.C. et al. Anatomia quantitativa e degradação *in vitro* de tecidos em cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.2, p.223-229, 1999

AKIN, D.E. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. **Agronomy Journal**, v. 81, n.1, p.17-25, 1989.

BUXTON, D.R.; RUSSEL, J.R. Lignin constituents and cell wall digestibility of grass and legume stems. **Crop Science**, v.28, n.3, p.553-558, 1988.

BRITO, C.J.F.A. et al. Anatomia quantitativa e degradação *in vitro* de tecidos em cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.2, p.223-229, 1999.



CHESSON, A. et al. Degradation of isolated grass mesophyll, epidermis and fibre cell wall in the rumen and by cellulolytic rumen bacteria in axenic culture. **Journal of Applied Bacteriology**, v.60, n.4, p.327-336, 1986.

CRAMPTON, E.W.; DONEFER, E.; LLOYD, L.E. A nutritive value index for forages. **Journal of Animal Science**, v.19, n.2, p.538-54. 1960.

GRABBER, J.H. et al. Digestion kinetics of parenchyma and sclerenchyma cell walls isolated from orchardgrass and switchgrass. **Crop Science**, v.32, n.3, p.806-810, 1992.

HANNA, W.W., MONSON, W.G., BURTON, G.W. Histological examination of fresh forages leaves after *in vitro* digestion. **Crop Science**, v.13, n.1, p.98-102, 1973.

HENDERSON, M.S.; D.L. ROBINSON. Environmental influences on yield and *in vitro* true digestibility of warm-season perennial grasses and the relationships to fiber components. **Agronomy Journal**, v. 74, n.6, p. 943-946, 1982.

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

JUNG, H.G., MERTENS, D.R., PAYNE, A.J. Correlation of acid detergent lignin and klason lignin with digestibility of forage dry matter and neutral detergent fiber. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.8, p.1622-1628, 1997.

JUNG, H.G.; VOGEL, K.P. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. **Journal of Animal Science**, v.62, p.1703-1712, 1986

JUNG, H.G. Forages lignins and their effects on fiber digestibility. **Agronomy Journal**, v.81, n.1, p.33-38, 1989.

JOHNSON, W.L.; GUERRERO, J.; PEZO, D. Cell wall constituents and *in vitro* digestibility of napier grass (*Pennisetum purpureum*). **Journal of Animal Science**, v.37, n. 5, p. 1255-1261, 1973.

KRAUS, J.E. ; ARDUIM, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica, EDUR. Rio de Janeiro, 1997, 198p.

LECHNER-DOLL, M.; KASKE, M.; ENGELHARDT, W.V. Factors affecting the mean retention time of particles in the forestomach of ruminants and camelids. In: TSUDA, T.; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. (Eds.) **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY, 7.**, 1989, Sendai, Japan. **Proceedings...**San Diego: Academic Press, 1991. p.455-482.

LEMPP, B. et al. Proporção e arranjo de tecidos de nove acessos de *Brachiaria brizantha*. In: REUNIÃO ANUAL [DA] SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. 5 p.

MACADAM, J.W., KERLEY, M.S., PIWONKA, E.J. Tiller development influences seasonal change in cell wall digestibility of big bluestem (*Andropogon gerardii*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.70, n.1, p. 79-88, 1996.

MOIR, K.W., LAWS, L., BLIGT, G. The relative importance of the total cell and quantity of digested cell wall in the regulation of the voluntary intake of grass hays by sheep. **Journal of Agricultural Science**, v.85, n.1, p. 39-43, 1975.

PACIULLO, D. S. C. et al. Correlações entre componentes anatômicos, químicos e digestibilidade *in vitro* da matéria seca de gramíneas forrageiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.30, n.3, , p. 955-963, 2001a.

PACIULLO, D.S.C. et al. Composição química e digestibilidade *in vitro* de lâminas foliares e colmos de gramíneas forrageiras, em função do nível de inserção no perfilho, da idade da planta e da estação de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.964-974, 2001b.

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

PINTO, A. P.; PEREIRA, E. S.; MIZUBUTI, I. Y. **Características nutricionais e formas de utilização da cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes**. 2003. p. 73-84. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

QUEIROZ, D.S.; GOMIDE, J.A.; MARIA, J. Avaliação da folha e do colmo de topo e base de perfilhos de três gramíneas forrageiras. 1. Digestibilidade *in vitro* e composição química. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n.1, p. 53-60, 2000.

RESENDE, M.D.V. de; DUARTE, J.B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.3, p.182-194, 2007.

RODELLA, R.A.; ISHIY, C.M.; MAIMONI-RODELLA, R.C.S. et al. Estudo quantitativo de características anatômicas de folhas de duas espécies de *Brachiaria*. **Revista Agrociência**, v.2, n.2, p.21-30, 1982.

TWIDWELL, E.K., JOHNSON, K.D., CHERNEY, J.H. Degradation of switchgrass anatomical tissue by rumen microorganisms. **Crop Science**, v.30, n.6, p.1321-1328, 1991.

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

VAN SOEST, P.J. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: Voluntary intake relation to chemical composition and digestibility. **Journal of Animal Science**, v.24, n. 3, p.834-844, 1965.

WILSON, J.R.. Environmental and nutritional factors affecting herbage quality. In: HACKER, J.B. (Ed.). *Nutritional limits to animal production from pastures*. Sta. Lucia: Commonwealth Agricultural Bureaux. 1982, p.111-131.

WILSON, J.R.; DEINUM, B.; ENGELS, F.M. Temperature effects on anatomy and digestibility of leaf and stem of tropical and temperate forage species. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.39, n.1, p.31-48, 1991.

WILSON, J.R.; BROWN, R.H.; WINDHAM, W.R. Influence of leaf anatomy on dry matter digestibility of C3, C4, and C3/C4 intermediate types of *Panicum* species. **Crop Science**, v.23, n.1, p.141-146, 1983.

WILSON, J.R.; MERTENS, D.R. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. **Crop Science**, v.35, n.1, p.251-259, 1995.

WILSON, J.R.; HATTERSLEY, P.W. Anatomical characteristics and digestibility of leaves of *Panicum* and other grass genera of C4 photosynthetic pathway. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.40, n.1, p.125-136, 1989.

WILSON, J.R. Variation of leaf characteristics with level of insertion on a grass tiller. II. Anatomy. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.27, n.3, p.355-364, 1976.

WILSON, J.R.; DEINUM, B.; ENGELS, F.M. Temperature effects on anatomy and digestibility of leaf and stem of tropical and temperate forage species. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.39, n.1, p.31-48, 1991.

## APÊNDICE

**APÊNDICE A** - Teste de agrupamento Scott Knott (s.k.) de 34 genótipos de *B. ruziziensis* das características anatômicas: EDA (espessura da epiderme adaxial -  $\mu\text{m}$ ), EBA (espessura da epiderme abaxial-  $\mu\text{m}$ ), EM (espessura do mesofilo-  $\mu\text{m}$ ), DX (diâmetro do xilema-  $\mu\text{m}$ ), DF (distância entre feixes-  $\mu\text{m}$ ), NF (número de feixes), NCB (número de células buliformes), AES (área do tecido esclerenquimático  $\mu\text{m}^2$ ), %CB (área de células buliformes -  $\mu\text{m}^2$ ).

Genotipo	EDA	s.k.	Genotipo	EBA	s.k.	Genotipo	DX	s.k.	Genotipo	EM	s.k.
99	4.99	a1	51	5.22	a1	48	19.12	a1	27	126.74	a1
51	5.02	a1	35	5.64	a1	93	19.37	a1	23	129.17	a1
3	5.29	a1	93	5.73	a1	66	20.89	a1	93	130.54	a1
83	5.36	a1	99	5.75	a1	33	22.15	a1	53	131.09	a1
93	5.41	a1	3	5.86	a1	27	22.51	a2	48	131.86	a1
70	5.46	a1	54	5.97	a1	14	23.57	a2	77	137.86	a1
100	5.49	a1	33	6.01	a1	35	23.75	a2	3	139.64	a1
35	5.53	a1	15	6.04	a1	51	23.80	a2	2	140.06	a1
14	5.60	a1	44	6.07	a1	1	23.93	a2	15	140.85	a1
48	5.64	a1	56	6.09	a1	97	24.16	a2	33	142.84	a1
15	5.67	a1	100	6.10	a1	3	24.17	a2	1	143.73	a1
44	5.70	a1	48	6.12	a1	15	24.19	a2	54	143.99	a1
6	5.80	a1	14	6.14	a1	99	24.24	a2	35	144.79	a1
64	5.87	a1	83	6.24	a1	23	24.56	a2	56	146.70	a1
58	5.88	a1	1	6.38	a1	77	24.82	a2	6	148.72	a2
23	5.90	a1	6	6.39	a1	40	25.10	a2	51	149.76	a2
43	5.95	a1	70	6.41	a1	2	25.41	a2	66	149.86	a2
54	6.04	a2	66	6.50	a2	56	25.52	a2	70	150.88	a2
41	6.06	a2	13	6.57	a2	83	25.79	a3	41	152.42	a2
56	6.09	a2	27	6.59	a2	96	26.23	a3	83	153.38	a2
66	6.10	a2	21	6.59	a2	7	26.79	a3	13	153.48	a2
1	6.13	a2	58	6.63	a2	43	27.00	a3	14	154.13	a2
77	6.13	a2	64	6.66	a2	100	27.23	a3	7	156.18	a2
96	6.14	a2	41	6.66	a2	6	27.45	a3	43	156.75	a2

## Apêndice A, conclusão

33	6.17	a2	23	6.70	a2	13	27.66	a3	64	157.32	a2
53	6.32	a2	96	6.74	a2	64	27.73	a3	40	158.12	a2
21	6.33	a2	77	6.76	a2	58	27.82	a3	97	158.55	a2
40	6.50	a2	40	7.03	a2	54	27.88	a3	99	158.65	a2
13	6.50	a2	53	7.03	a2	70	28.35	a3	96	161.90	a2
27	6.59	a3	43	7.09	a2	53	28.60	a3	21	161.91	a2
97	6.88	a3	2	7.44	a3	8	28.72	a3	100	162.33	a2
2	6.89	a3	8	7.53	a3	41	29.52	a3	8	170.08	a2
8	7.07	a3	97	7.64	a3	21	29.83	a3	44	171.11	a2
7	7.09	a3	7	7.70	a3	44	31.03	a3	58	172.86	a2

Médias seguidas de mesma letra na colunas não diferem pelo teste de F.

**APÊNDICE A** - Teste de agrupamento Scott Knott s.k. de 34 genótipos de *B. ruziziensis* das características anatômicas: EDA (espessura da epiderme adaxial -  $\mu\text{m}$ ), EBA (espessura da epiderme abaxial-  $\mu\text{m}$ ), EM (espessura do mesofilo-  $\mu\text{m}$ ), DX (diâmetro do xilema-  $\mu\text{m}$ ), DF (distância entre feixes-  $\mu\text{m}$ ), NF (número de feixes), NCB (número de células buliformes), %L (área do tecido esclerenquimático  $\mu\text{m}^2$ ), %CB (área de células buliformes -  $\mu\text{m}^2$ ).

Genotipo	DF	s.k.	Genotipo	NF	s.k.	Genotipo	NCB	s.k.	Genotipo	%L	s.k.	Genotipo	ACB	s.k.
41	19.87	a1	44	4.56	a1	44	4.28	a1	35	2586.92	a1	97	3140.09	a1
77	20.45	a1	58	4.56	a1	8	4.36	a1	93	2870.16	a1	48	3190.94	a1
97	20.56	a1	43	4.67	a1	43	4.50	a1	77	3039.34	a1	93	3334.56	a1
23	20.81	a1	100	4.72	a1	58	4.53	a1	48	3054.98	a1	13	3351.75	a1
56	21.09	a1	2	4.72	a1	7	4.67	a2	33	3140.13	a1	8	3367.00	a1
100	21.21	a1	8	4.83	a1	2	4.69	a2	14	3191.82	a1	99	3459.79	a1
99	21.96	a1	15	4.89	a1	14	4.72	a2	23	3353.94	a1	2	3501.12	a1
35	22.04	a1	13	4.89	a1	54	4.75	a2	27	3456.07	a1	23	3519.06	a1
93	22.11	a1	14	4.89	a1	100	4.78	a2	2	3482.42	a1	14	3553.03	a1
8	22.41	a1	96	4.89	a1	1	4.80	a2	1	3489.61	a1	3	3556.46	a1
13	22.81	a1	35	4.89	a1	40	4.81	a2	15	3496.12	a1	70	3583.29	a1
33	22.81	a1	40	4.89	a1	35	4.83	a2	21	3615.53	a1	66	3598.33	a1
83	23.23	a1	7	4.95	a1	15	4.86	a3	7	3698.22	a1	56	3614.29	a1
96	23.54	a1	56	5.00	a2	70	4.89	a3	40	3701.35	a1	58	3630.38	a1
27	23.61	a1	54	5.00	a2	96	4.89	a3	83	3720.39	a1	83	3653.76	a1
51	23.76	a1	1	5.03	a2	53	4.89	a3	56	3721.71	a1	21	3746.90	a1
54	24.14	a1	27	5.06	a2	6	4.92	a3	66	3723.46	a1	41	3773.53	a1

APÊNDICE A, conclusão

3	24.35	a1	77	5.06	a2	27	4.92	a3	97	3776.59	a1	27	3817.93	a1
40	24.38	a1	83	5.06	a2	13	4.95	a3	54	3797.66	a1	43	3820.93	a1
21	24.87	a1	3	5.08	a2	41	4.95	a3	99	3802.77	a1	44	3867.02	a1
64	24.99	a1	6	5.11	a2	21	4.97	a3	43	3830.49	a1	35	4017.49	a2
6	25.01	a1	51	5.11	a2	56	4.97	a3	100	3887.73	a1	54	4136.60	a2
14	25.61	a1	33	5.11	a2	97	4.97	a3	51	3899.42	a1	6	4141.47	a2
58	25.76	a1	70	5.11	a2	51	5.00	a3	70	3929.86	a1	51	4155.06	a2
44	26.23	a2	97	5.11	a2	77	5.03	a3	6	4186.32	a2	64	4168.24	a2
70	26.89	a2	53	5.14	a2	64	5.08	a3	3	4331.00	a2	7	4177.66	a2
1	27.06	a2	21	5.14	a2	66	5.11	a3	64	4507.02	a2	1	4198.32	a2
15	27.49	a2	66	5.17	a2	83	5.11	a3	41	4551.64	a2	40	4232.52	a2
48	27.75	a2	99	5.17	a2	99	5.14	a3	13	4637.56	a2	100	4280.94	a2
7	27.82	a2	48	5.25	a2	3	5.14	a3	53	4647.95	a2	53	4310.86	a2
43	29.28	a2	41	5.31	a2	93	5.17	a3	96	4723.12	a2	96	4367.85	a2
66	29.30	a2	23	5.33	a2	33	5.22	a3	8	4787.87	a2	15	4397.84	a2
2	31.27	a3	64	5.36	a2	23	5.25	a3	58	5193.54	a2	77	4679.05	a2
53	35.57	a4	93	5.47	a2	48	5.39	a3	44	5502.11	a2	33	4944.41	a2



**APÊNDICE B** - Teste de agrupamento Scott Knott (s.k.) dos 34 genótipos de *B. ruzizensis* para as variáveis qualitativas: FDA (fibra em detergente ácido), FDN (fibra em detergente neutro), lignina, celulose, PB (proteína bruta).

Genótipo	Celulose	s.k.	Genótipo	DIVMS	s.k.	Genótipo	FDA	s.k.
41	27.15	a1	64	57.72	a1	41	32.53	a1
35	27.28	a1	70	57.87	a1	35	32.64	a1
97	27.7	a1	3	57.89	a1	21	33.46	a1
40	27.85	a1	48	58.58	a1	51	33.56	a1
14	28.08	a1	27	58.78	a1	40	33.61	a1
58	28.11	a1	56	59.14	a1	8	33.67	a1
53	28.19	a1	93	59.27	a1	14	33.69	a1
51	28.26	a1	43	59.68	a2	100	33.71	a1
44	28.28	a1	7	59.72	a2	97	33.87	a1
6	28.36	a1	15	59.82	a2	23	34.01	a1
21	28.42	a1	66	59.98	a2	53	34.30	a1
100	28.43	a1	44	59.99	a2	3	34.35	a1
8	28.5	a1	83	60.08	a2	13	34.37	a1
23	28.61	a1	1	60.25	a2	44	34.45	a1
3	28.63	a1	53	60.28	a2	6	34.52	a1
96	28.66	a1	97	60.29	a2	58	34.53	a1
7	28.67	a1	2	60.32	a2	77	34.55	a1
66	28.67	a1	6	60.35	a2	66	34.66	a1
13	28.81	a1	13	60.40	a2	96	34.70	a1
1	28.9	a1	99	60.51	a2	7	34.75	a1

APÊNDICE B, conclusão

83	29.19	a1	33	60.52	a2	2	34.82	a1
77	29.22	a1	58	60.65	a2	1	34.86	a1
54	29.34	a1	35	60.66	a2	27	35.10	a1
70	29.58	a1	77	60.68	a2	54	35.14	a1
27	29.63	a1	8	60.71	a2	43	35.27	a1
43	29.76	a1	100	60.75	a2	99	35.35	a1
2	29.81	a1	23	60.80	a2	83	35.36	a1
33	29.92	a1	96	60.88	a2	15	35.63	a1
64	29.95	a1	21	60.96	a2	33	35.70	a1
99	29.96	a1	51	61.07	a2	93	35.72	a1
56	30.01	a1	14	61.48	a2	56	35.86	a1
48	30.08	a1	54	61.65	a2	70	36.00	a1
93	30.1	a1	41	62.25	a2	64	36.07	a1
15	30.56	a1	40	63.66	a2	48	36.24	a1

**APENDICE B** - Teste de agrupamento Scott Knott (s.k.) dos 34 genótipos de *B. ruzizensis* para as variáveis qualitativas: FDA (fibra em detergente ácido), FDN (fibra em detergente neutro), lignina, celulose, PB (proteína bruta).

Genótipo	FDN	s.k.	Genótipo	Lignina	s.k.	Genótipo	PB	s.k.
40	64.96	a1	40	2.25	a1	93	6.67	a1
41	65.06	a1	97	2.37	a1	27	6.95	a1
35	65.23	a1	41	2.46	a1	7	7.06	a1
97	65.29	a1	14	2.46	a1	66	7.23	a1
14	65.32	a1	35	2.48	a1	70	7.26	a1
21	65.43	a1	21	2.51	a1	48	7.4	a1
96	65.51	a1	53	2.51	a1	1	7.41	a1
54	65.65	a1	58	2.54	a1	100	7.45	a1
51	65.93	a1	66	2.55	a1	15	7.53	a1
13	65.94	a1	96	2.55	a1	35	7.56	a1
100	65.96	a1	77	2.58	a1	2	7.57	a1
53	66.05	a1	51	2.6	a1	21	7.75	a1
58	66.16	a1	6	2.6	a1	40	7.76	a1
44	66.18	a1	3	2.61	a1	99	7.77	a1
66	66.19	a1	100	2.61	a1	14	7.79	a1
7	66.43	a1	23	2.64	a1	51	7.8	a1
2	66.44	a1	27	2.7	a1	41	7.8	a1
6	66.44	a1	33	2.72	a2	6	7.94	a1
56	66.58	a1	2	2.73	a2	54	8	a1
33	66.70	a1	70	2.74	a2	23	8.1	a2

APENDICE B, conclusão

23	66.70	a1	44	2.75	a2	97	8.1	a2
8	66.99	a1	54	2.76	a2	13	8.12	a2
43	67.13	a1	1	2.79	a2	8	8.17	a2
99	67.28	a1	43	2.81	a2	56	8.19	a2
1	67.29	a1	15	2.85	a2	83	8.35	a2
77	67.42	a1	13	2.86	a2	64	8.36	a2
93	67.43	a1	83	2.86	a2	77	8.56	a2
3	67.66	a1	8	2.88	a2	43	8.6	a2
70	67.73	a1	7	2.94	a2	53	8.69	a2
83	67.79	a1	99	3	a2	58	8.7	a2
15	67.83	a1	93	3	a2	44	8.7	a2
64	67.85	a1	48	3.01	a2	3	8.75	a2
48	68.30	a1	56	3.06	a2	96	8.87	a2
27	68.51	a1	64	3.29	a2	33	9.47	a2

**APÊNDICE C** – Médias das FDA (fibra em detergente ácido), FDN (fibra em detergente neutro), lignina, celulose, PB (proteína bruta) nas épocas de cultivo das águas e da seca para os 38 genótipos avaliados.

Genótipo	1	1	2	2	3	3	6	6	7	7	8	8	13	13	14	14
Época	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca
Celulose	31.37	26.42	33.01	26.61	32.48	24.77	32.16	24.57	30.62	26.72	31.50	25.49	30.58	27.05	31.92	24.24
DIVMS	59.78	60.72	58.47	62.17	56.33	59.44	57.47	63.24	59.59	59.84	59.37	62.04	60.73	60.08	55.71	67.25
FDA	37.67	32.05	38.26	31.39	37.82	30.88	38.08	30.96	36.24	33.27	36.28	31.05	36.22	32.52	38.21	29.17
FDN	67.95	66.64	68.29	64.59	69.48	65.83	68.00	64.89	66.21	66.66	67.92	66.06	66.08	65.80	68.64	61.99
Lignina	3.35	2.22	3.27	2.18	3.23	1.98	3.42	1.78	3.37	2.51	3.68	2.09	3.29	2.43	3.20	1.73
PB	8.49	6.64	7.75	7.32	7.76	7.05	7.85	7.65	9.58	7.82	9.74	7.63	8.46	7.06	8.58	10.36
Genótipo	15	15	21	21	23	23	27	27	33	33	35	35	40	40	41	41
Época	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca
Celulose	32.59	28.54	31.74	25.10	31.01	26.20	33.69	25.56	34.10	25.75	29.25	25.30	31.85	23.85	30.88	23.42
DIVMS	58.49	61.15	58.95	62.96	59.93	61.67	56.05	61.51	58.18	62.85	60.02	61.30	60.55	66.77	59.60	64.91
FDA	37.47	33.78	37.45	29.48	37.15	30.86	39.19	31.01	40.49	30.91	34.74	30.54	38.63	28.58	36.40	28.65
FDN	67.93	67.73	66.70	64.16	67.50	65.90	71.03	65.99	69.00	64.40	65.23	65.24	68.55	61.37	66.95	63.17
Lignina	3.24	2.45	3.14	1.88	3.25	2.02	3.42	1.98	3.55	1.89	3.05	1.90	3.05	1.46	3.32	1.59
PB	7.55	6.56	7.97	7.61	8.88	8.23	6.96	7.56	7.67	7.22	9.36	8.03	8.35	7.64	8.58	8.91
Genótipo	43	43	44	44	48	48	51	51	53	53	54	54	56	56	58	58
Época	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca
Celulose	34.16	25.36	31.38	25.18	33.99	26.17	31.14	25.39	32.09	24.29	32.28	26.40	33.66	26.37	32.80	23.42
DIVMS	56.41	62.95	59.77	60.21	56.90	60.25	58.34	63.80	57.98	62.57	60.45	62.85	56.91	61.36	57.35	63.96

APÊNDICE C, conclusão

FDA	40.02	30.52	37.36	31.54	40.01	32.47	36.21	30.92	37.87	30.73	38.80	31.48	39.68	32.04	38.38	30.68
FDN	69.62	64.64	66.62	65.74	69.96	66.63	66.79	65.07	67.35	64.75	67.34	63.97	68.70	64.45	68.98	63.33
Lignina	3.67	1.94	3.36	2.13	3.77	2.24	3.18	2.01	3.34	1.68	3.31	2.21	3.73	2.38	3.45	1.62
PB	7.37	7.10	8.46	7.93	7.53	7.61	8.22	7.38	7.77	7.83	8.73	7.97	7.38	8.96	7.42	8.11
Genótipo	64	64	66	66	70	70	77	77	83	83	93	93	96	96	97	97
Época	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca	Água	Seca
Celulose	34.05	25.85	32.36	24.97	33.91	25.25	32.83	25.60	34.36	24.01	33.45	26.76	32.10	25.21	31.78	23.62
DIVMS	54.48	60.95	56.95	63.02	55.01	60.73	58.48	62.88	56.97	63.19	57.54	61.00	58.21	63.54	57.78	62.80
FDA	38.60	33.54	38.79	30.53	40.12	31.88	38.87	30.23	40.61	30.10	39.07	32.38	38.14	31.25	38.35	29.39
FDN	68.48	67.22	68.51	63.88	69.88	65.58	70.16	64.69	70.67	64.91	69.68	65.17	66.88	64.14	67.03	63.54
Lignina	4.12	2.46	3.36	1.74	3.33	2.15	3.24	1.91	3.96	1.77	3.73	2.27	3.01	2.09	3.13	1.61
PB	8.37	8.83	7.71	8.52	6.89	6.46	8.12	6.71	8.20	7.99	7.50	6.40	8.12	8.60	8.42	7.78
Genótipo	99	99	100	100												
Época	Água	Seca	Água	Seca												
Celulose	33.62	26.29	33.30	23.55												
DIVMS	57.84	63.18	56.20	65.29												
FDA	39.78	30.92	38.81	28.61												
FDN	68.40	66.15	69.38	62.54												
Lignina	3.85	2.14	3.52	1.70												
PB	9.02	8.72	8.03	7.85												

**ARTIGO 3****CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E QUANTIFICAÇÃO DE  
DNA DE *Brachiaria ruziziensis*****Resumo**

A análise da quantidade de DNA nuclear por citometria de fluxo é uma ferramenta alternativa para certificação da ploidia em um grande número de indivíduos. Entretanto, quando a quantidade de DNA das espécies é muito similar, é necessária a realização de contagens de cromossomos para determinar com segurança a ploidia das espécies. Com esse propósito, foi determinada a quantidade de DNA e o número cromossômico de genótipos de *Brachiaria ruziziensis* da coleção de germoplasma da Embrapa Gado de Leite- Juiz de Fora/MG. A determinação da quantidade de DNA foi feita por citometria de fluxo, utilizando o tampão  $MgSO_4$  e como padrão interno de comparação as espécies *Solanum lycopersicum* e *Raphanus sativus*. Os cromossomos metafásicos foram obtidos pelo método de esmagamento em ácido acético 45%. A coloração foi feita com Giemsa 5%. A análise de variância seguida do teste de Scott Knott confirmou que há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao conteúdo de DNA e indicou a formação de três grupos de genótipos. O primeiro grupo incluindo 83 genótipos de *B. ruziziensis*, com média de 1,48pg DNA/2C e com  $2n=2x=18$  cromossomos. O segundo grupo constituído por *B. decumbens* com 2,90pg DNA/2C e  $2n=4x=36$  cromossomos e o terceiro agrupamento com *B. brizantha*, contendo 3,47pg de DNA/2C e  $2n=4x=36$ . O cariótipo da *B. ruziziensis* apresentou 8 cromossomos metacêntricos e 1 submetacêntrico e foi considerado simétrico.

**Palavras-chave:** número de cromossomos, ploidia, conteúdo de DNA, cariótipo, *Brachiaria*.

**Abstract**

The analysis of nuclear DNA by flow cytometry is an alternative tool for certification of ploidy in a large number of individuals. However, when the DNA content of species is very similar, it is necessary chromosome counts to determine with certainty the ploidy of the species. With this purpose, we determined the DNA content and chromosome number of genotypes of *Brachiaria ruziziensis* germplasm collection of Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora / MG. The determination of the DNA content was evaluated by flow cytometry using the buffer and MgSO<sub>4</sub> as an reference pattern of comparison *Solanum lycopersicum* species and *Raphanus sativus*. The metaphase chromosomes were obtained by the method of crushing 45% acetic acid. Staining was performed with 5% Giemsa. The analysis of variance followed by the Scott Knott test confirmed that there were significant differences ( $p < 0.05$ ) compared to DNA content and indicated the formation of three groups of genotypes. The first group including 83 genotypes of *B. ruziziensis*, averaging 1.48 pg DNA/2C and  $2n = 2x = 18$  chromosomes. The second group consists of *B. decumbens* with 2.90 pg DNA/2C and  $2n = 4x = 36$  chromosomes and the third group with *B. brizantha*, containing 3.47 pg of DNA/2C and  $2n = 4x = 36$ . The karyotype of *B. ruziziensis* showed 8 metacentric chromosomes and a submetacentric and was considered symmetrical

**Keywords:** chromossome number, ploidy, DNA content, karyotipe, *Brachiaria*.



## 1. Introdução

O gênero *Brachiaria* pertence à família Poaceae e é constituído de aproximadamente 100 espécies (Reinvoize et al., 1996) distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta, mas com grande concentração no continente africano, em habitats variados. Atualmente, as espécies mais cultivadas são *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. Embora não seja a espécie com maior área cultivada, a demanda por sementes de *B. ruziziensis* tem aumentado, acompanhando o incremento da integração entre agricultura e pecuária e despertando interesse para o melhoramento genético (SOUZA SOBRINHO, 2005).

O número básico de cromossomos relatado para o gênero é  $x = 6, 7, 8$  e  $9$ , com predominância de  $x=9$  (DARLINGTON; WYLIE, 1955;; BASAPPA et al., 1987; VALLE; SAVIDAN, 1996; RISSO-PASCOTTO, 2006; BOLDRINI et al., 2009).

A maioria das espécies é poliploide, preferencialmente tetraploide ( $2n=4x=36$ ) e apomítica (BASAPPA et al. , 1987; BERNINI; MARIN-MORALES, 2001; MENDES BONATO et al., 2002; 2006; RISSO-PASCOTTO et al., 2005; SOTO-MAYOR-RÍOS et al. , 1968; UTSUNOMIYA et al., 2005; VALLE; SAVIDAN, 1996). O destaque é para a *B. ruziziensis* que apresenta modo de reprodução sexual e diploidia ( $2n=2x=18$ ) (VALLE; SAVIDAN, 1996), o que a credencia como uma excelente alternativa para ampliação da base genética do gênero e para aplicações no melhoramento genético.

Os relatos na literatura sobre a citogenética da *B. ruziziensis* são restritos e as informações não são suficientes para a caracterização cromossômica da espécie. A primeira descrição feita por Bernini e Marin-Morales (2001) com um acesso de *B. ruziziensis* caracteriza o cariótipo com a presença de nove pares de cromossomos metacêntricos e posicionamento do

satélite no par de cromossomos 8. Anteriormente, Valle et al. (1987) havia identificado os nove cromossomos por meio de mapas paquitênicos e relatou que os cromossomos eram submetacêntricos, com a região organizadora do nucléolo (RON) no par 7.

Como parte dos programas de melhoramento genético, a avaliação sistemática dos genótipos deve ser feita em diferentes etapas para identificar materiais duplicados e potenciais candidatos ou elites presentes na coleção de trabalho. Dentre as avaliações, a citogenética é indispensável para discriminação de genótipos, certificação de ploidias, determinação de número cromossômico e de similaridades cariotípicas, entre outros. Estas informações podem auxiliar a tomada de decisão dos melhoristas e contribuir para reduzir o tempo na escolha dos genótipos mais estáveis e compatíveis.

Considerando a existência de diferentes níveis de ploidia em *Brachiaria*, a contagem do número de cromossomos associada à quantificação do DNA via citometria de fluxo constitui uma estratégia de segurança para o melhorista no período que precede a realização dos cruzamentos, especialmente quando se dispõe de uma grande quantidade de genótipos para avaliar.

A determinação da quantidade de DNA por citometria de fluxo tem sido amplamente utilizada na determinação de ploidia em gramíneas (BUSO et al., 1999; JARRET et al., 1995; JOHNSON et al., 1998; PENTEADO, 2000; RAYBURN et al., 1989; SEAL, 1983). Ishigaki (2010) e Timbó (2010) utilizaram a citometria de fluxo para estimar o tipo de genoma (C e Cx) de diferentes espécies de *Brachiaria* afirmando ser uma técnica eficiente e com boa acurácia.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo determinar o conteúdo de DNA e o número cromossômico de genótipos de *Brachiaria ruziziensis*

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Material Vegetal

Foram avaliados 85 genótipos de *Brachiaria* pertencentes ao programa de melhoramento genético de *Brachiaria ruziziensis*, desenvolvido pela Embrapa Gado de Leite, em parceria com a UFLA. Esses materiais foram cultivados no Campo Experimental de Coronel Pacheco (MG).

### 2.2. Análise do conteúdo de DNA

Para a determinação da quantidade de DNA, seis amostras de cada planta foram avaliadas, das quais foram utilizadas, aproximadamente, 20 e 30 mg de tecido foliar jovem, juntamente com a mesma quantidade de tecido foliar jovem de *Solanum lycopersicum* e *Raphanus sativus* (padrão de referência de quantidade de DNA  $2C = 1.96\text{pg}$  e  $2C = 1.11\text{pg}$  respectivamente). Os tecidos foram triturados em placa de Petri contendo 1mL de tampão  $\text{MgSO}_4$  (DOLEZEL; BARTOS, 2005; DOLEZEL; BINAROVA) gelado para a obtenção de suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997). O tecido triturado foi aspirado por meio de duas camadas de gaze e a suspensão nuclear posteriormente filtrada em uma malha de  $50\mu\text{m}$ . À suspensão nuclear foram adicionados  $25\mu\text{L}$  de iodeto de propídio e  $2,5\mu\text{L}$  de RNase. Para cada amostra foram analisados, pelo menos, 10 mil núcleos.

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), sendo os histogramas obtidos no software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.8 (disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>).

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência, como mostrado a seguir:

As quantidades de DNA nuclear (pg) das amostras foram estimadas por meio da equação:

$$\text{DNA amostra} = \left( \frac{\text{G1 amostra}}{\text{G1 padrão}} \right) \times \text{DNA padrão, onde:}$$

DNA amostra = quantidade de DNA nuclear da amostra (pg);

G1 amostra = posição do pico G1 da amostra;

G1 padrão = posição do pico G1 da planta padrão

DNA padrão = conteúdo de DNA da planta padrão Em seguida, com base na estimativa de DNA da amostra também foi calculado o Valor C (quantidade de DNA gamético – com número cromossômico  $n$ ) e o Valor Cx (quantidade de DNA de cada genoma- com número cromossômico básico  $x$ ) e transformado para a unidade mega pares de bases (Mpb) onde, 1pg de DNA é igual a 978 Mpb (DOLEZEL et al., 2003; GREILHUBER et al., 2005).

Para confiabilidade dos resultados de citometria, foram utilizados somente histogramas com coeficientes de variação abaixo de 5%.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com duas repetições. A análise de variância foi realizada, com o auxílio do software SISVAR, e as médias do conteúdo de DNA foram comparadas pelo teste de média Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

A qualidade experimental foi aferida pela estimação do parâmetro acurácia seletiva (RESENDE;DUARTE, 2007).

### **2.3. Análise citogenética**

Para a obtenção de cromossomos somáticos foi utilizada a metodologia proposta por Techio et al. (2002) com algumas modificações para *Brachiaria*.

Pontas de raízes foram coletadas e submetidas a pré-tratamentos com ciclohexamida 25 mg.L e hidroxiquinoleína 300 mg.L (1:1) por 2 horas e 45 minutos, a 4°C. Após o tratamento, as raízes foram lavadas em água destilada por 5 min. (3x), secadas e fixadas em solução de Carnoy (etanol: ácido acético - 3:1) por, no mínimo, 24 horas. Em seguida, as raízes foram submetidas à maceração enzimática em solução de pectinase (50%): celulase (100%), por 3 horas e 30 minutos, seguida de hidrólise em HCl 1N, a 60°C, por 5 minutos. Para a montagem das lâminas, foi utilizada a técnica de esmagamento e coloração com Giemsa 5%, por 10 minutos.

As melhores metáfases foram capturadas por meio de câmera acoplada ao microscópio. Os cromossomos foram medidos por meio do programa Image Tool 3.0 da UTHSCA (The University of Texas Health Science Center in San Antonio). Para a construção dos idiogramas foram usadas as médias do comprimento do braço curto e do braço longo (BC e BL, respectivamente) de cada par homólogo, medido em cinco metáfases mitóticas de cada espécie. Foram calculados o comprimento total do cromossomo ( $CT = BC + BL$ ), o comprimento total do lote haplóide ( $CTLH = \sum Cti$ ), o índice centromérico ( $IC = [BC/(BC+BL)] \times 100$ ) e o comprimento relativo de cada cromossomo ( $CR = Cti/CTLH$ ). Os cromossomos foram classificados de acordo com a posição do centrômero segundo Levan et al. (1964) e confirmada pelos critérios propostos por Guerra (1986). A assimetria cariotípica foi calculada de acordo com Stebbins (1958) e Zarco (1986), sendo este último estimado pelo índice de assimetria intracromossômica ( $A_1$ ) e intercromossômica ( $A_2$ ), por meio das equações:

$$A_1 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n \frac{b_i}{B_i}}{n} \quad A_2 = \frac{s}{x}$$

onde:  $A_1$  = Índice de Assimetria intracromossomal, variando entre 0 e 1 (não depende do número e tamanho do cromossomo);  $n$  = número de pares de cromossomos homólogos,  $b_i$  = comprimento médio dos braços curtos em cada par de cromossomos homólogos;  $B_i$  = comprimento médio dos braços longos em cada par de cromossomos homólogos;  $A_2$  = Índice de Assimetria intercromossômica (não depende do número cromossômico);  $s$  = desvio padrão e  $X$  = média do comprimento dos cromossomos.

Também foi calculado o índice TF% (índice de assimetria), considerando a soma de todos os índices centroméricos de cada par e dividindo-se pelo número de pares cromossômicos (HUZIWARA, 1962).

O idiograma foi construído com base na posição do centrômero e comprimento médio dos cromossomos homólogos em ordem decrescente.

### **3. Resultados e Discussão**

Considerando que todos histogramas gerados pelas análises do conteúdo de DNA apresentaram coeficientes de variações inferiores a 5%, a metodologia utilizada foi considerada adequada para determinação da quantidade de DNA de *Brachiaria* (Figura 1 A-F), de acordo com Galbraith et al. (1983) e Dolezel e Bastos (2005).

**Tabela 1** – Resumo da ANAVA para o conteúdo de DNA (pg) de 85 genótipos de *Brachiaria* sp. da Embrapa Gado de Leite.

FV	DNA			
	GL	SQ	QM	P
Genótipo	84	35.220	0.41	<0.001
Erro	425	3.130	0	
Total	509	38.360		

Timbó (2010), concluiu em seu trabalho que CVs a partir de 1,60% já são suficientes para gerar erros nas estimativas do conteúdo de DNA para alguns genótipos de *Brachiaria* devido a super estimativa da quantidade de DNA para alguns genótipos, sendo um deles o genótipo *B. brizantha* cv. Marandu (3,91 pg) observado no tratamento com o tampão MgSO<sub>4</sub> com o padrão de referência ervilha, um C.V de apenas 1,60% e uma nota de 3,66 do histograma (alta qualidade).

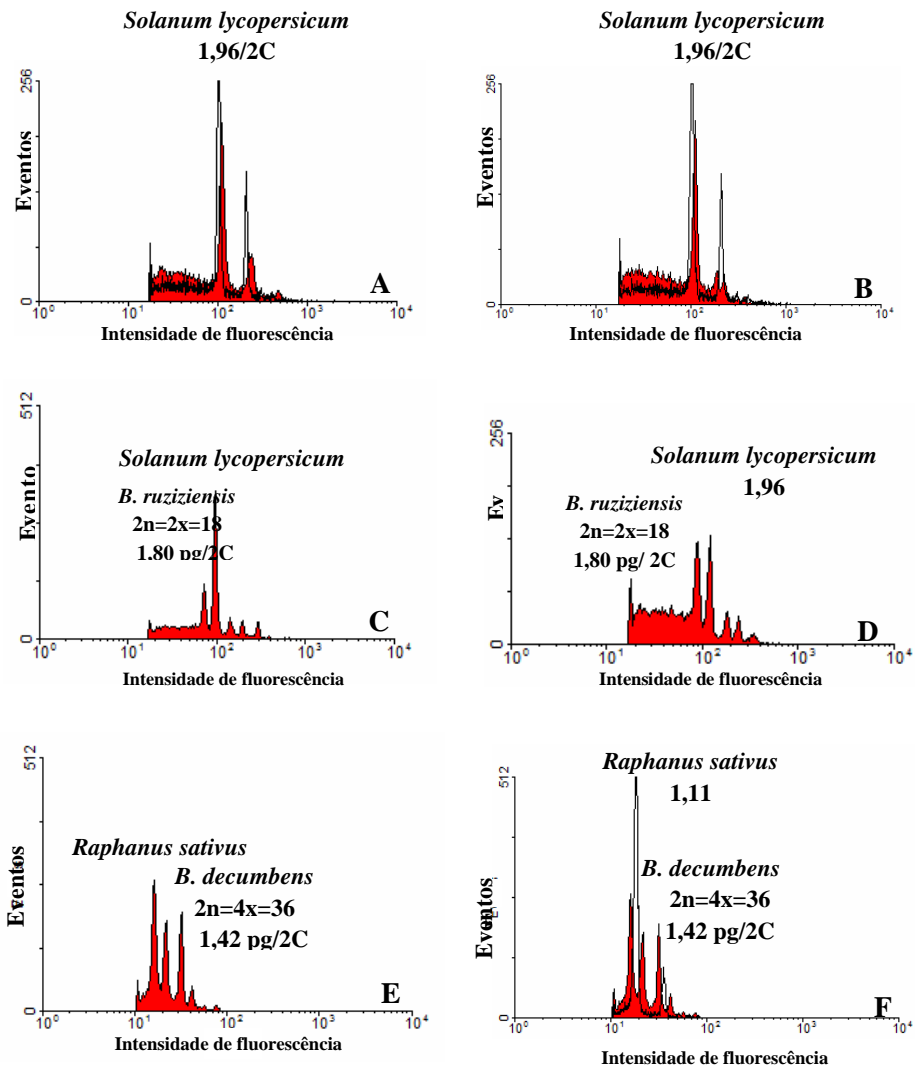
Seguindo a escala de notas propostas por Timbó (2010), os histogramas gerados para todos os materiais analisados (Figura 1 A-F), foram avaliados com notas 4 e/ou 5, ou seja, apresentaram baixa quantidade de partículas Sub G1 com ocorrência dos picos G1 da amostra e do padrão mais definidos que em 3 ou baixa quantidade de partículas Sub G1 com ocorrência dos picos G1 da amostra e do padrão com mais alta definição, respectivamente.

Na análise de variância para o teste de médias da quantificação de DNA, os materiais analisados foram separados em três grupos ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1 e Apêndice A), sendo que para o primeiro grupo o conteúdo médio de DNA foi de 3,47pg (Valor C = 1696,83Mbp C<sup>-1</sup> e Valor Cx = 424,20 Mbp C<sup>-1</sup>) e incluiu um genótipo identificado como *B. brizantha* no programa de melhoramento genético. O segundo grupo incluiu *B. decumbens* (Tabela 2), a qual apresentou 2,90pg de conteúdo de DNA, com valores C e Cx, de 1418,1 Mbp C<sup>-1</sup> e 354,52 Mbp C<sup>-1</sup> (Tabela 3 e Apêndice A). O terceiro grupo reuniu os genótipos de *B.*

*ruziziensis* com 1,48pg de DNA (Valores C e Cx = 724,35 Mbp C<sup>-1</sup>) variando de 1,42 até 1,56pg, utilizando dois padrões de referências (*Solanum lycopersicum* e *Raphanus sativus*) e tampão MgSO<sub>4</sub>. A acurácia do experimento foi considerada muito alta (98,99%) conforme Resende e Duarte (2007).

Para o segundo genótipo considerando somente os valores obtidos pela citometria de fluxo, não seria possível relacionar à qual espécie pertence. Entretanto, a identificação na coleção de trabalho da Embrapa Gado de Leite, confirma que trata-se da espécie *B. decumbens*. Essa é uma situação que requer necessariamente o uso das contagens cromossômicas para certificação da ploidia e da espécie.





**Figura 1** - Histogramas do conteúdo de conteúdo de DNA nuclear em folhas de *Brachiaria* obtidos por citometria de fluxo. O primeiro pico em cada histograma é referente ao Pico G1 das espécies de *Brachiaria* e o segundo é o Pico G1 da amostra de referência. A) *B. Brizantha* -genótipo 74 demonstrando sobreposição dos picos na análise do conteúdo de DNA; B) *B. decumbens* - genótipo 94 demonstrando sobreposição dos picos na análise do conteúdo de DNA; e C) *B. ruziziensis* - genótipo 28; D) *B. ruziziensis* - genótipo 127; E e F) representa *B. decumbens* - genótipo 56 com o padrão de referência (*Raphanus sativus*).

Timbó (2010) encontrou valores médios de conteúdo de DNA,  $3,52 \pm 0,07$  e  $3,74 \pm 0,06$ , para *B. brizantha*. Os valores obtidos para *B. ruziziensis* também coincidem com os descritos na literatura. Ishigaki et al. (2009) obtiveram valores de conteúdo de DNA para esta espécie de 1,41 pg para as plantas diploides e 2,77 pg para as plantas tetraploidizadas. Os autores utilizaram o tampão contendo Tris-HCl e como padrão de referência a *Oriza sativus*. Timbó (2010) estimou a quantidade média de DNA nos acessos de *B. ruziziensis* em 1,74 pg para os genótipos 2x, utilizando o padrão de referência *Pisum sativum* e tampão  $MgSO_4$ .

Estas variações nos valores das estimativas do conteúdo de DNA se devem a vários fatores como, por exemplo: calibração do citômetro de fluxo, planta padrão de referência, material vegetativo, tampão de extração dos núcleos e fluorocromo utilizados.

Neste trabalho observou-se que os valores de C aumentaram conforme a ploidia e o inverso ocorreu para valores de Cx, sendo condizente com a literatura (Tabela 3). Nos trabalhos de Ishigaki (2010) e Timbó (2010) a citometria de fluxo também foi usada para estimar a quantidade de DNA gamético (C) e a quantidade de DNA de cada genoma (Cx) de diferentes espécies de *Brachiaria* e observaram que os valores C aumentaram de acordo com aumento do nível de ploidia. Já os resultados de Cx foram maiores em cultivares apomíticas comparada com a sexual estabelecendo um relação entre a quantidade de DNA de cada genoma com o modo de reprodução. Timbó (2010) apresentaram resultados condizentes com a conclusão.

**Tabela 2** - Estimativa da quantidade de DNA, Valor C, Valor C<sub>x</sub>, número cromossômico e nível de ploidia da *Brachiaria* sp.

Espécie	Médias			Número Cromossômico (2n)	Nível de ploidia
	Conteúdo de DNA (pg)*	Valor C (**Mbp C <sup>-1</sup> )	Valor C <sub>x</sub> (Mbp C <sub>x</sub> <sup>-1</sup> )		
<i>B. ruziziensis</i>	1.48 a	724,35	724,35	18	2x
<i>B. decumbens</i>	2.9 b	1418,1	354.52	36	4x
<i>B. brizantha</i>	3,47 c	1696,01	424,00	36	4x

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente aos 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. \*\* Mpb= Mega pares de bases.

A técnica de citometria de fluxo têm sido amplamente utilizada na determinação de ploidia em gramíneas (BUSO et al., 1999; JARRET et al., 1995; JOHNSON et al., 1998; PENTEADO, 2000; RAYBURN et al., 1989; SEAL, 1983) neste estudo permitiu discriminar todos os genótipos com segurança. Contudo uma das espécies não pode ser certificada sendo necessário incluir as contagens cromossômicas para fazer a certificação da ploidia e auxiliar na discriminação taxonômica dos genótipos.

Em *Brachiaria*, Ishigaki et al. (2009) utilizaram a citometria de fluxo e a contagem de cromossomos para a constatação da eficiência de protocolos de indução de duplicação cromossômica. Timbó (2010) confirmou a estimativa do conteúdo de DNA por meio da contagem cromossômica, sendo observados 18, 27 e 36 cromossomos para as espécies diploides, triploides e tetraploides, respectivamente.

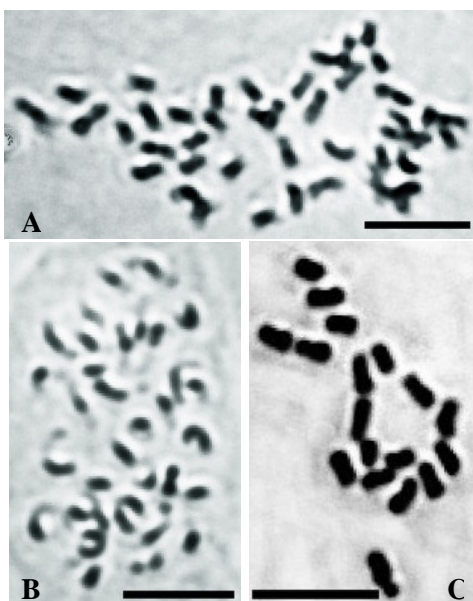
Em outro estudo, Penteado et al. (2000) utilizaram *B. decumbens* como planta padrão para determinar a quantidade de DNA em espécies de *Brachiaria*. Para interpretação dos resultados foi considerado índice 1 para plantas com 2x = 18 visando ajustar o citômetro de fluxo. A partir desta padronização, foram comparados os índices obtidos na determinação da ploidia de 435 acessos de 13 espécies de *Brachiaria*. Os autores também encontraram dificuldades na

interpretação de dados devido à variação no conteúdo de DNA tanto dentro de espécies quanto entre e recorreram à contagem cromossômica.

Nas contagens cromossômicas realizadas neste estudo foram confirmados  $2n=18$  para *B. ruzizensis* e  $2n=36$  para *B. decumbens* e *B. brizantha* (Figura 2).

O comprimento total do lote haplóide (CTLH) foi 22,69 $\mu$ m, 36,95 $\mu$ m e 43,75 $\mu$ m para *B. ruzizensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha*, respectivamente. Bernini e Marin-Morales (2001) na análise de um acesso *B. ruzizensis* e descreveram a existência de similaridades entre o valor do CTLH (18,22  $\mu$ m) e a morfologia cromossômica desse acesso e o diplóide D5 de *B. decumbens* ( $2n=18$ ). Para *B. brizantha* e *B. decumbens*, os valores de comprimento do lote haplóide relatados pelos autores, variaram de 36,52 a 41,55 $\mu$ m e 17,94 a 36,49 $\mu$ m respectivamente. Essas diferenças no comprimento do lote haplóide indicam variação no conteúdo total da cromatina e podem ser devido à diferenças de genótipos e à condensação dos cromossomos visualizados nas metáfases.

Em função do tamanho reduzido dos cromossomos e devido à dificuldades em obter cromossomos espalhados e com morfologia bem definida não foi possível obter o idiograma para *B. brizantha* e *B. decumbens*. Para *B. ruzizensis*, o idiograma está apresentado na Figura 3.



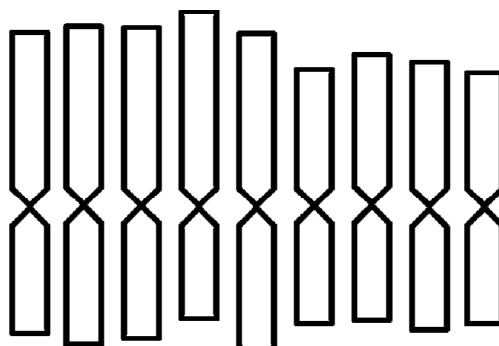
**Figura 2** - Metáfases mitóticas de *Brachiaria* sp. A. *B. brizantha*,  $2n=36$ ; B. *B. decumbens*,  $2n=36$  e C) *B. ruziziensis*,  $2n=18$ .

Os resultados obtidos corroboram com a descrição na literatura para as três espécies. Bernini e Marin-Morales (2001) caracterizaram o cariótipo de 12 acessos e cinco espécies de *Brachiaria*. Os autores relataram variações no número cromossômico em *B. decumbens* ( $2n=18$  e  $36$ ), *B. brizantha* apresentaram  $2n=36$  e *B. ruziziensis*,  $2n=18$ .

Em relação à caracterização cariotípica de *B. ruziziensis* foi observado, de acordo com a classificação de Levan et al. (1964) e confirmada pelos critérios de Guerra (1986), oito cromossomos metacêntricos e um submetacêntrico, resultando na fórmula cariotípica ( $8m + 1sm$ ) (Tabela 4, Figuras 2 e 3). A diferença observada entre o maior e o menor cromossomo foi de  $0,58\mu\text{m}$ . O alto grau de condensação dos cromossomos e as similaridades no tamanho cromossômico dificultaram a identificação das características morfológicas, exceto o centrômero, sendo possível a visualização de satélite no par de

cromossomos 7. Provavelmente, o número de constrições secundárias foi subestimado devido ao posicionamento terminal ou intersticial o que torna difícil a detecção da mesma por coloração convencional. Portanto, são necessárias técnicas mais refinadas, tais como FISH, para caracterização mais precisa do cariótipo.

Na primeira descrição do cariótipo feita para *B. ruziziensis* por Bernini e Marin-Morales (2001) a fórmula cariotípica cita a ocorrência de dois pares de cromossomos metacêntricos *stricto sensu* e os outros sete pares metacêntricos (2M e 7m), com presença de satélite no par de cromossomos 8. Os autores classificaram o cariótipo como simétrico.



**Figura 3** - Idiograma de *Brachiaria ruziziensis* ( $2n=18$ ).

Anteriormente, Valle et al. (1987) havia identificado os nove cromossomos por meio de mapas paquitênicos e observando a distribuição e tamanho dos cromômeros e medições cromossômicas. Esses dados mostraram que a maioria dos cromossomos eram submetacêntricos, com a região organizadora do nucléolo (RON) no par 7.

O comprimento dos cromossomos, incluindo o comprimento dos braços longo e curto (Tabela 4), são critérios usados para determinação dos índices de Assimetria Intracromossômica ( $A_1$ ) e Assimetria Intercromossômica ( $A_2$ ),

conforme proposto por Zarco (1986). Para *B. ruziziensis* foi observado  $A1=0,23$  e  $A2=0,09$ , o que caracteriza um cariótipo simétrico (Figura 2). Essa classificação foi confirmada pelo índice TF (43,41%), o qual é considerado alto quando atinge valores próximos a 50% (HUZIWARA, 1962) e pelos critérios de Stebbins (1971)

**Tabela 4** – Morfometria dos cromossomos (homólogos) da *B. ruziziensis*: braço longo (BL), braço curto (BC), comprimento total do cromossomo (Cti), razão entre braços (RB), índice centromérico (IC), comprimento relativo dos cromossomos (CR), comprimento total do lote haplóide (CTLH), e classificação dos cromossomos de acordo com Levan et al. (1964) e Guerra (1986).

Cromossomo	BL	BC	x	Cti	RB	IC	RB	IC	RB	CR
1	1.18	1.02	1.10	2.20	1.16	46.39	m	m	m	9.68
2	1.52	1.23	1.37	2.74	1.24	44.70	m	m	m	12.08
3	1.31	1.01	1.16	2.32	1.31	43.36	m	m	m	10.22
4	1.21	1.04	1.13	2.25	1.17	46.13	m	m	m	9.92
5	1.27	1.06	1.17	2.33	1.19	45.56	m	m	m	10.27
6	1.58	1.16	1.37	2.74	1.36	42.45	m	m	m	12.09
7	1.57	1.22	1.39	2.78	1.29	43.68	m	m	m	12.27
8	1.71	0.98	1.34	2.68	1.75	36.37	sm	sm	sm	11.83
9	1.53	1.11	1.32	2.64	1.37	42.14	m	m	m	11.65

CTLH=22.69

Cariótipos mais simétricos estão relacionados com valores de TF% próximos de 50%, enquanto que valores mais baixos indicam assimetria.

Os índices de assimetria cariotípica têm sido extensamente utilizados para inferir mecanismos de evolução cromossômica em plantas (PASZKO, 2006). Aumentos na assimetria cariotípica são decorrentes de translocações, inversões e translocações desiguais detectáveis através da análise do comportamento meiótico (ZARCO, 1986). Bernini e Marin Morales sugeriram para o gênero *Brachiaria* que alterações estruturais como deleções e adições e, principalmente, poliploidia estão envolvidas na evolução .

Em *B. ruziziensis*, Bernini e Marin Morales (2001) encontraram índices semelhantes para  $A1=0,15$  e  $A2= 0,07$  e observaram tendência de assimetria em direção à poliploidia em espécies do gênero *Brachiaria* através dos índices calculados.

Segundo Stebbins (1971) cariótipos simétricos são compostos por cromossomos com tamanhos aproximadamente iguais e com posição centromérica mediana ou submediana. Já nos cariótipos assimétricos, o complemento cromossômico é constituído de cromossomos com centrômeros em posição mediana a subterminal ou terminal e com grandes diferenças nos comprimentos cromossômicos, formando um cariótipo heterogêneo. O autor ainda afirmou que a evolução tende a assimetria, ou seja, cariótipos simétricos são considerados primitivos. Sendo um primeiro caminho para assimetria proposto por Stebbins (1958) a formação de cromossomos acrocêntricos e um segundo o incremento na diferença de tamanho do maior para o menor cromossomo do cariótipo.

#### **4. Conclusão**

Por meio da determinação do conteúdo de DNA associado com a contagem de cromossomos foi possível discriminar genótipos de *B. ruziziensis*, *B. brizantha* e *B. decumbens*.

*B. ruziziensis* apresentou fórmula cariotípica com 8 cromossomos metacêntricos e 1 submetacêntrico ( $8m+1sm$ ) e cariótipo simétrico.



## REFERÊNCIAS

BASAPPA G. P.; MUNIYAMMA M.; CHINNAPPA C. C. An investigation of chromosome numbers in the genus *Brachiaria* (Poaceae:Paniceae) in relation to morphology and taxonomy. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, n.11, p. 2297-2309, 1987.

BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios**, v. 104, n.407, p. 157-171, 2001.

BOLDRINI KR, PAGLIARINI MS AND VALLE CB. Meiotic behavior of a nonaploid accession endorses  $x = 6$  for *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Geneist and Molecular Research**, v.8, n.4, p.1444-1450, 2009.

BUSO, G.S.C.; PENTEADO, M.I. de O.; POZZOBON, M.T.; PEÑALOZA, A. del P.S.; RANGEL, P.H.; FERREIRA, M.E. **Citometria de fluxo, contagem cromossômica e RAPD na identificação de genomas e espécies de *Oryza***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biologia, 1999. 44p. ( EMBRAPA Recursos Genéticos e Biologia. Boletim de Pesquisa, 10) 1999.

DARLINGTON C.D. and WYLIE A.P., Chromosome atlas of flowering plants. George Allan & Unwin Ltd, London.1955, 519p.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 38, n. 3, p. 285-302, Apr. 1997.

DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 113-112, Apr. 1989.

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

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.

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.

GOULART, J. C. **Citogenética e anatomia foliar de acessos e progênies de *Brachiaria***. 2008. 71 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et. al. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, n.4 p. 741-743, 1986.

GREILHUBER, J. et al. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 255-260, Jan. 2005.

HUZIWARA, Y. Karyotype analysis in some genera of compositae VII. Further studies on the chromosome of *Aster*. **American Journal of Botany**. v, 49, p.116-119, 1962.

ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. **Japanese Society of Grassland Science**, Tokyo, v. 55 n. 3, p. 164-170, Sept. 2009.

ISHIGAKI, G. et al. Estimation of genome size in *Brachiaria* species. **Japanese Society of Grassland Science**, Tokyo, v. 56, n. 4, p. 240-242, Dec. 2010.

JARRET, R.L. et al. DNA contents in *Paspalum* spp. determined by flow cytometry. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.42, n.3, p.237-242, 1995.

JOHNSON, P.G.; RIORDAN, T.P.; ARUMUGANATHAN, K. Ploidy level determinations in buffalograss clones and populations. **Crop Science**, Madison, v.38, n.2, p.478-482, 1998.

MENDES, D. V. et al. Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 150, n.4, p. 441-446, 2006.

MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M. S.; FORLI, F.; VALLE, C. B.; PENTEADO, M. I. O. Chromosome number and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica**, v.125, n. 3, p. 419-425, 2002.

PASZKO, B. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. **Plant Systematics and Evolution**, v. 258, n. 1-2, p. 39-48. 2006.

PENTEADO, M. I. de O. et al. **Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2000. 32 p. (EMBRAPA Gado de Corte. Boletim de Pesquisa, 11).

RAYBURN, A.L. et al. Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* l. by flow cytometry. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.40, n.220, p.1179-1183, 1989.

RENVOIZE, S.A.; CLAYTON, W.D.; KABUYE, C.H.S. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. do, ed. ***Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement***. Cali: CIAT/Brasília: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p.1-15. (CIAT Publication, 256).

RESENDE, M.D.V. de; DUARTE, J.B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.3, p.182-194, 2007.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae:Panicoideae:Paniceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 53, n. 1, p. 7-10, Jan. 2006.

RISSO-PASCOTTO C, PAGLIARINI M.S.; VALLE C.B.D.O. Multiple spindles and cellularization during microsporogenesis in an artificially induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). **Plant Cell Reports**. v.23, n.8, p. 522–527, 2005.

SEAL, A.G. DNA variation in *Festuca*. **Heredity**, Edinburgh, v.50, n.3, p.225-236, 1983.

SOUZA SOBRINHO, F. Melhoramento de forrageiras no Brasil. In: SIMPOSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 5., 2005, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2005. 1CD-ROM.

SOTOMAYOR-RIOS A. et al. Description and cytology of a form of Signalgrass (*Brachiaria brizantha* Stapf.) and its agronomic behavior compared to Guinea grass (*Panicum maximum* Jack.). **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 44, n.4, p. 208–220, 1968.

STEBBINS , G. L. **Chromosomal Evolution in Higher Plants**. New York: Addison-Wesley, 1971.

STEBBINS, G. L. Longevity, habitat, and release of genetic variability in the higher plants. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**, v.23, p. 365-378, 1958.

STEPHAN NIELEN et al. Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. **Sexual Plant Reproduction**, v.23, n.1, p. 45-51, 2010

TECHIO, V. H. et al. Cytotaxonomy of some species and of interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 203-209, 2002.

TIMBÓ, A. L. de O. **Duplicação cromossômica e identificação do nível de ploidia utilizando citometria de fluxo em *Brachiaria* spp.** 2010.100p. Tese ( Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

UTSUNOMIYA K.S; PAGLIARINI M.S.; VALLE C.B.D.O. Microsporogenesis in tetraploid accessions of *Brachiaria nigropedata* (Ficalho & Hiern) Stapf (Gramineae). *Biocell* v.29, n.3, p.295–301, 2005.

VALLE, C. B. do; SINGH, R. J.; MILLER, D. A. Pachytene chromosomes of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. **Plant Breeding**, Berlin, v. 78, n.1, p. 75-78, 1987.

VALLE, C. B. do; SAVIDAN, Y. H. Genetics, cytogenetic and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.). ***Brachiaria*: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; Brasília: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 288. (CIAT Publication, 256).

ZARCO, C. R. **A new method for estimating karyotype asymetry**. *Taxon*, Utrech, v. 35, n.3, p. 526-530, 1986.

## APENDICE

**APENDICE A** – Médias da ANAVA da quantificação de DNA (pg) dos 85 genótipos das três espécies *Brachiaria brizantha* (BB), *Brachiaria decumbens* (BD), *Brachiaria ruziziensis* (BR) e *Brachiaria ruziziensis comercial* (BRC e BRC0).

Espécie	s.k.	Médias Conteúdo de DNA (pg)*	Valor C (**Mbp C <sup>-1</sup> )	Valor Cx (Mbp C <sub>x</sub> <sup>-1</sup> )	Número Cromossômico (2n)	Nível de ploidia
8	al	1.42	695.20	695.20	18	2x
9	al	1.44	701.72	701.72	18	2x
65	al	1.44	704.98	704.98	18	2x
2	al	1.45	708.23	708.23	18	2x
6	al	1.45	709.05	709.05	18	2x
50	al	1.45	709.87	709.87	18	2x
4	al	1.45	709.87	709.87	18	2x
70	al	1.45	709.87	709.87	18	2x
85	al	1.45	709.87	709.87	18	2x
76	al	1.45	709.87	709.87	18	2x
30	al	1.46	711.50	711.50	18	2x
31	al	1.46	711.50	711.50	18	2x
56	al	1.46	713.94	713.94	18	2x
99	al	1.46	713.94	713.94	18	2x
55	al	1.46	713.94	713.94	18	2x
1	al	1.46	715.57	715.57	18	2x
34	al	1.46	715.57	715.57	18	2x
53	al	1.46	715.57	715.57	18	2x
75	al	1.47	716.39	716.39	18	2x
83	al	1.47	716.39	716.39	18	2x

APENDICE A, continuação

82	al	1.47	716.39	716.39	18	2x
98	al	1.47	716.39	716.39	18	2x
95	al	1.47	716.39	716.39	18	2x
40	al	1.47	717.20	717.20	18	2x
37	al	1.47	717.20	717.20	18	2x
58	al	1.47	717.20	717.20	18	2x
64	al	1.47	718.01	718.01	18	2x
51	al	1.47	718.01	718.01	18	2x
45	al	1.47	718.01	718.01	18	2x
21	al	1.47	718.01	718.01	18	2x
22	al	1.47	718.83	718.83	18	2x
27	al	1.47	718.83	718.83	18	2x
66	al	1.47	718.83	718.83	18	2x
25	al	1.47	719.65	719.65	18	2x
46	al	1.47	719.65	719.65	18	2x
72	al	1.47	719.65	719.65	18	2x
77	al	1.47	720.46	720.46	18	2x
28	al	1.48	722.09	722.09	18	2x
54	al	1.48	722.09	722.09	18	2x
80	al	1.48	722.09	722.09	18	2x
69	al	1.48	722.09	722.09	18	2x
26	al	1.48	722.09	722.09	18	2x
32	al	1.48	722.09	722.09	18	2x
42	al	1.48	722.09	722.09	18	2x
20	al	1.48	722.90	722.90	18	2x
48	al	1.48	722.90	722.90	18	2x
13	al	1.48	722.90	722.90	18	2x
35	al	1.48	722.90	722.90	18	2x
90	al	1.48	723.72	723.72	18	2x

APENDICE A, continuação

89	al	1.48	724.54	724.54	18	2x
86	al	1.48	724.54	724.54	18	2x
23	al	1.48	725.35	725.35	18	2x
71	al	1.48	725.35	725.35	18	2x
15	al	1.48	725.35	725.35	18	2x
97	al	1.49	727.79	727.79	18	2x
49	al	1.49	727.79	727.79	18	2x
73	al	1.49	728.61	728.61	18	2x
36	al	1.49	728.61	728.61	18	2x
29	al	1.49	730.24	730.24	18	2x
24	al	1.50	731.87	731.87	18	2x
3	al	1.50	731.87	731.87	18	2x
62	al	1.50	731.87	731.87	18	2x
16	al	1.50	733.50	733.50	18	2x
10	al	1.50	734.32	734.32	18	2x
84	al	1.50	734.32	734.32	18	2x
33	al	1.50	734.32	734.32	18	2x
7	al	1.50	734.32	734.32	18	2x
11	al	1.51	735.95	735.95	18	2x
92	al	1.51	735.95	735.95	18	2x
5	al	1.51	736.76	736.76	18	2x
52	al	1.51	738.39	738.39	18	2x
93	al	1.51	739.21	739.21	18	2x
41	al	1.51	739.21	739.21	18	2x
59	al	1.52	740.84	740.84	18	2x
96	al	1.52	741.65	741.65	18	2x
43	al	1.52	741.65	741.65	18	2x
BRC	al	1.52	744.10	744.10	18	2x
BR	al	1.52	744.91	744.91	18	2x

APENDICE A, conclusão

19	a1	1.53	745.73	745.73	18	2x
100	a1	1.53	748.99	748.99	18	2x
39	a1	1.53	748.99	748.99	18	2x
44	a1	1.53	748.99	748.99	18	2x
14	a1	1.56	763.66	763.66	18	2x
ENI	a2	2.90	1417.28	354.32	36	4x
BB	a3	3.47	1696.01	424.00	36	4x