

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Biologia reprodutiva de cana-de-açúcar (*Saccharum x officinarum*) e de um
parente selvagem (*S. villosum* Steud) com potencial de contaminação por
pólen**

Jayça Amate Marim Toledo

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2015**

Jayça Amate Marim Toledo
Bióloga

Biologia reprodutiva de cana-de-açúcar (*Saccharum x officinarum*) e de um parente selvagem (*S. villosum* Steud) com potencial de contaminação por pólen

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **GIANCARLO CONDE XAVIER OLIVEIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Toledo, Jayça Amate Marim

Biologia reprodutiva de cana-de-açúcar (*Saccharum x officinarum*) e de um parente selvagem (*S. villosum* Steud) com potencial de contaminação por pólen / Jayça Amate Marim Toledo. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

99 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cana-de-açúcar 2. Fluxo gênico 3. *Saccharum* I. Título

CDD 633.61
T649b

“ Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

*Dedico este trabalho aos meus pais Jair (in
memoriam) e Rita de Cassia.
Ao meu irmão Franklin e ao meu noivo Lino
Fernando. Sem vocês absolutamente nada
seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos de curso e pesquisa com o objetivo de adquirir o título de mestre em ciências pelo programa de genética e melhoramento de plantas da ESALQ, nunca havia deparado com situações tão desafiadoras como as passadas por esse período de tempo. Sinto que esses dois anos me fizeram crescer intelectualmente, profissionalmente e pessoalmente, o que haveria de crescer em cinco anos em situações consideradas normais ou tranquilas.

Agradeço à Deus primeiramente, por ser o verdadeiro criador e dono da minha vida e destino. Por sempre ouvir minhas orações e apelos, e por aquietar meu coração nos momentos de aflição. Por ter me dado uma família linda e por colocar em minha vida grandes amigos que aqui fiz, e amigos que deixei pelo caminho, porém, que hoje e sempre serão minhas preciosidades. Agradeço à Deus também por toda força e por todas adversidades que apareceram pelo caminho, sem elas, não teria maturidade para superar qualquer desafio. Todas as pedras em meu caminho construíram o que eu sou, e o que virei a ser.

Agradeço ao meu pai, Jair (*in memoriam*), que me viu crescer em todos os sentidos, até esses últimos meses da minha vida. Meu pai para sempre será o herói da minha vida, a pessoa que investiu sua vida em prol da sua família e que sempre foi minha fortaleza. Eu tenho certeza, que onde ele estiver, ele está orgulhoso de mim e dele mesmo, porque sem ele nada em minha vida seria possível.

Agradeço à minha mãe Rita de Cássia por ser meu maior exemplo de força, por compartilhar comigo minhas alegrias e conquistas, mas também, as inseguranças e incertezas. Por ser uma amiga e mãe que soube educar seus filhos com amor e dedicação. Também serei para sempre sua amiga.

Agradeço ao meu irmão, que sempre esteve presente em minha vida. Quando criança, brincamos juntos, rimos, brigamos e fizemos as pazes. Na adolescência e durante a juventude somos acima de tudo, amigos e cúmplices, temos muito em comum e pensamos muito parecidos. Vejo nosso futuro como grandes amigos, como sempre fomos e o tempo virá trazer mais alegria e cumplicidade. Agradeço por toda amizade e amor.

Ao meu noivo Lino Fernando por estar comigo durante esses dois anos de mestrado e completamente presente nos meus momentos de alegria e aflição. Você soube como me acalmar nos momentos mais difíceis e como me fazer acreditar mais em mim. Você me ensinou a me despreocupar e a ter mais paciência. Sem você não teria conseguido me manter calma nos momentos que mais precisei. Obrigada por todo amor, carinho e preocupação comigo.

Agradeço aos meus colegas de trabalho, do laboratório de evolução: Hendrie, Gláucia, Vivian, Débora, Josi, Léo e Vinicius e aos técnicos Ronaldo e Carlos, pelas amizades, contribuições e conselhos. Agradeço ao Eduardo Bressan, por todo companheirismo, pelos incentivos e conselhos, por conseguir os materiais que precisei em vários momentos e por me ajudar a correr atrás de tudo que foi necessário. Você foi uma peça essencial, nada teria sido possível sem sua colaboração. Agradeço ao meu orientador Giancarlo pela orientação e por todo o comprometimento com o nosso projeto de pesquisa. Tudo teria sido impossível sem vocês.

Agradeço à Técnica Mônica Lanzoni Rossi e a Prof^a. Dr^a Adriana Pinheiro Martinelli do laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) por terem cedido o espaço do laboratório e por além disso, se comprometerem tão ativamente com minha pesquisa. À Mônica que foi uma verdadeira amiga e soube ouvir e aconselhar em todas as minhas aflições. Por ter se envolvido em minhas alegrias e tristezas como uma verdadeira amiga, agradeço eternamente toda sua contribuição e toda a sua amizade. Sem você eu não teria conseguido finalizar este trabalho.

Agradeço ao Prof. Siu Mui Tsai por ceder o microscópio de luz para realizar as imagens de secção histológicas. Agradeço ao Centro de Microscopia e Imagem da FOP- Unicamp de Piracicaba sob coordenação do Prof. Pedro Duarte Novaes e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA), sob coordenação do Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima e o Prof. Dr. Francisco A. O. Tanaka por disponibilizem os microscópios eletrônico de varredura e transmissão para realização do trabalho e por tanto me ensinarem sobre microscopia de varredura. Agradeço também ao técnico Renato pela paciência e disposição em sempre colaborar e aos alunos Guilherme e Aline do laboratório de microscopia que me estenderam a mão quando eu mais precisei da colaboração. Agradeço à Ma. Regina Shirasuna, do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo pela assistência científica.

Agradeço à todos os meus queridos amigos e colegas do departamento de genética de todos os laboratórios, os quais não seria possível citar pois são muitos, em especial aos colegas do laboratório da Prof. Elisabeth Ann Veasey e por cederem o espaço da casa de vegetação durante todo meu mestrado. À todos os técnicos do departamento de genética, por contribuírem com o transporte das minhas plantas e com todo o material que foi necessário para que essa pesquisa fosse possível.

Agradeço aos amigos que fiz em outros departamentos da ESALQ/CENA que compartilharam comigo uma história inesquecível ao longo desses dois anos, principalmente

aos amigos do Grupo de Oração Universitário (GOU) que torceram por mim em vários momentos difíceis e se alegraram com minhas conquistas.

Às minhas colegas de república: Anna Rita e Gabriela, por serem tão compreensivas nos meus momentos de angústia. Pelas palavras de incentivo e por me aguentarem nesse fim de mestrado, rsrs.

Aos órgãos de fomento que me financiaram, para que eu me mantivesse durante esses dois anos de pesquisa: Fundação CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

À todos a minha eterna gratidão.

*“A boa madeira não cresce com sossego;
Quanto mais forte o vento, mais fortes as árvores.”*
J. Willard Marriott

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 13 |
| ABSTRACT..... | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| Referências..... | 18 |
| 2 OBJETIVO | 19 |
| 2.1 Objetivos específicos | 19 |
| 3 HIPÓTESES | 21 |
| 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 23 |
| 4.1 Classificação geral do gênero <i>Saccharum</i> L..... | 23 |
| 4.1.1 Taxonomia do gênero <i>Saccharum</i> sp. (LINNAEUS, 1753) | 23 |
| 4.1.2 Centro de Origem..... | 25 |
| 4.1.3 Espécies nativas de <i>Saccharum</i> sp. ocorrentes no Brasil..... | 26 |
| 4.2 Reprodução e descrição floral de Cana-de-açúcar (<i>Saccharum x officinarum</i>) | 28 |
| 4.3 Estudos morfológicos como subsídios para pesquisas taxonômicas | 29 |
| 4.3.1 Estudos morfológicos para identificar gêneros e espécies..... | 29 |
| 4.3.2 Análise de desenvolvimento pós-seminal como auxílio à taxonomia de <i>Saccharum</i> sp. | 30 |
| 4.3.3 Estudos morfológicos em grãos de pólen de <i>Saccharum</i> sp. | 31 |
| 4.4 Estudos morfológicos como subsídios para pesquisas com fluxo gênico | 32 |
| 4.4.1 Estudos de viabilidade polínica de <i>Saccharum</i> sp. | 32 |
| 4.4.2 Estudos sobre sexagem | 33 |
| 4.4.3 Estudos de fenologia e distribuição geográfica | 34 |
| Referências..... | 36 |
| 5 FENOLOGIA E COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE <i>Saccharum villosum</i> Steud. | 43 |
| Resumo | 43 |
| Abstract..... | 43 |
| 5.1 Introdução | 44 |
| 5.2 Material e Métodos | 45 |
| 5.2.1 Monitoramento do florescimento em campo | 45 |
| 5.2.2 Monitoramento do comportamento <i>ex situ</i> | 46 |
| 5.2.2.1 Análises de sementes malformadas | 46 |
| 5.2.3 Análises de formação de embrião | 47 |
| 5.3 Resultados e Discussão | 47 |
| 5.4 Conclusão..... | 52 |

| | |
|--|----|
| Referências | 52 |
| 6 SEXAGEM DE HÍBRIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR E VIABILIDADE POLÍNICA DE <i>Saccharum</i> sp. PROVENIENTES DA REGIÃO CENTRO-SUL DO BRASIL | 57 |
| Resumo | 57 |
| Abstract | 57 |
| 6.1 Introdução..... | 58 |
| 6.2 Material e Métodos..... | 59 |
| 6.2.1 Materiais..... | 59 |
| 6.2.2 Métodos | 59 |
| 6.2.2.1 Sexagem de híbridos de cana-de-açúcar | 59 |
| 6.2.2.2 Viabilidade polínica de <i>Saccharum</i> sp. | 60 |
| 6.3 Resultados e Discussão | 61 |
| 6.4 Conclusão | 72 |
| Referências | 73 |
| 7 MORFOLOGIA POLÍNICA DE <i>Saccharum villosum</i> Steud..... | 75 |
| Resumo | 75 |
| Abstract | 75 |
| 7.1 Introdução..... | 76 |
| 7.2 Material e Métodos..... | 77 |
| 7.3 Resultados e Discussão | 78 |
| 6.4 Conclusão | 83 |
| Referências | 83 |
| 8 DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL DE <i>Saccharum villosum</i> Steud..... | 87 |
| Resumo | 87 |
| Abstract | 87 |
| 8.1 Introdução..... | 88 |
| 8.2 Material e Métodos..... | 89 |
| 8.3 Resultados e Discussão | 90 |
| 8.4 Conclusão | 95 |
| Referências | 95 |
| 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 99 |

RESUMO

Biologia reprodutiva de cana-de-açúcar (*Saccharum x officinarum*) e de um parente selvagem (*S. villosum* Steud) com potencial de contaminação por pólen

A cana-de-açúcar atualmente encontra-se em posição de destaque como terceira maior cultivar em área plantada no Brasil. Porém, a cultura ainda não se beneficia de tecnologias de engenharia genética no mercado brasileiro. A razão disso, está diretamente relacionada às normativas de liberação da CTNBio (RN05), a qual requer informações relevantes acerca da capacidade dispersiva de estruturas reprodutivas de organismos geneticamente modificados (OGMs) e seus mecanismos de dispersão. A fim de não comprometer o curso natural da evolução do gênero *Saccharum*, em que pertence a Cana-de-açúcar, a CTNBio quer também informações à cerca de seus parentes silvestres como sua área de ocorrência e seus mecanismos reprodutivos de dispersão com o objetivo de eliminar o risco de hibridação/introgressão com os OGMs. Através de estudos prévios, sabe-se que a cana-de-açúcar é altamente cultivada na região nordeste e centro-sul do Brasil e que as espécies pertencentes ao gênero *Saccharum* selvagens como *S. asperum* (Nees) Steud. e *S. villosum* Steud. são encontradas na região Centro-Sul. Pensando nisso, a espécie *S. villosum* chama a atenção pelo fato ocorrer próximo à áreas de plantio de cana-de-açúcar, onde haveria risco da contaminação de transgenes. O objetivo do trabalho buscou trazer informações do ciclo reprodutivo da espécie *S. villosum* em comparação ao comportamento reprodutivo de cana-de-açúcar na região Centro-Sul do Brasil. Também buscou-se adquirir informações relevantes sobre a morfologia e a viabilidade dos grãos de pólen da espécie e de vários híbridos da cana-de-açúcar que ocorrem na região em questão. Assim como, informações sobre a morfologia pós-seminal da espécie *S. villosum*, com o objetivo de auxiliar na taxonomia do grupo. Nos estudos sobre o ciclo de vida da espécie *S. villosum*, foram encontrados florescimento de Abril à Julho com comportamento alógamo e de Setembro à Março com comportamento autógamo. Esses resultados auxiliam estudos de fluxo gênico entre híbridos de cana-de-açúcar e *S. villosum* em determinadas épocas do ano. Além disso, as características morfológicas dos grãos de pólen de *S. villosum* correspondem às do gênero *Saccharum*. As características reprodutivas dos híbridos de cana-de-açúcar na região Centro-Sul do Brasil possibilita o fluxo gênico interespecífico, por conterem grãos de pólen viáveis e formação de sementes. A sincronia do florescimento entre as espécies estudadas mostrou-se correspondentes. As características morfológicas no momento da germinação das sementes de *S. villosum* apresentou-se correspondentes aos integrantes do complexo *Saccharum* como o gênero *Erianthus*, esses dados irão auxiliar trabalhos futuros no reconhecimento taxonômico à nível genérico e específico. Portanto, a espécie *S. villosum* apresenta características reprodutivas viáveis, os quais podem resultar em cruzamento interespecífico com híbridos de cana-de-açúcar. Esses resultados irão auxiliar futuros estudos de fluxo gênico entre as espécies analisadas.

Palavras-chave: *Saccharum*; Morfologia reprodutiva; Fluxo gênico

ABSTRACT

Reproductive biology of sugarcane (*Saccharum x officinarum*) and a wild relative (*S. villosum* Steud) with pollen contamination potential

The sugarcane currently is in a prominent position as the third largest growing in planted area in Brazil. However, the culture still does not benefit from genetic engineering technologies in Brazil. The reason is directly related to the regulatory release of CTNBio (RN05), which requires relevant information about the dispersive ability of reproductive structures of genetically modified organisms (GMOs) and their dispersal mechanisms. In order not to compromise the natural course of evolution of the genus *Saccharum*, which belongs to sugarcane, CTNBio also want the information about their wild relatives as its range and their reproductive mechanisms of dispersion in order to eliminate the risk of hybridization introgression with GMOs. Through previous studies, it is known that sugarcane is highly cultivated in the northeast and South-Central Brazil and the wild species of the genus *Saccharum* as *S. asperum* (Nees) Steud. and *S. villosum* Steud. are found in the South-Central region. Thinking about it, *S. villosum* species draws attention because occur near areas of sugarcane plantation where there is risk of transgene contamination. The objective sought to bring information of the reproductive cycle of the species *S. villosum* compared to reproductive behavior of sugarcane in the South-Central region of Brazil. Also sought to acquire relevant information about the morphology and viability of pollen grains of the species and various hybrids of sugarcane that occur in the region in question. As well as information on post-seminal morphology of the species *S. villosum*, in order to assist the group's taxonomy. In studies on the life cycle of the species *S. villosum*, they were found flowering April to July with allogamous behavior and from September to March with autogamous behavior. These results help studies of gene flow between hybrid sugarcane and *S. villosum* at certain times of year. Furthermore, the morphological characteristics of the pollen grains *S. villosum* correspond to the genus *Saccharum*. The reproductive characteristics of sugarcane hybrids in South-Central region of Brazil enables interspecific gene flow, to contain viable pollen grains and seed formation. The timing of flowering among the species studied showed up correspondents. The morphological characteristics at the time of germination of *S. villosum* has performed corresponding to the *Saccharum* complex members as *Erianthus*, this data will assist future work on taxonomic recognition of the generic and specific level. Therefore, the species *S. villosum* shows viable reproductive characteristics, which may result in interspecific cross with sugarcane hybrids. These results will help future studies of gene flow between species analyzed.

Keywords: *Saccharum*; Reproductive Morphology; Gene flow

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a cana-de-açúcar ocupa uma área de, aproximadamente, 8,5 milhões hectares (ha) no Brasil, o que a torna a terceira maior cultura em área plantada, atrás somente da soja e do milho (CONAB, 2012). Apesar de sua importância econômica para o agronegócio, a cultura da cana-de-açúcar ainda não se beneficia de tecnologias de engenharia genética como cultivares geneticamente modificadas - GM, no mercado brasileiro. Porém, muitas pesquisas vêm sendo realizadas com este intuito e a Comissão Técnica Nacional de Biotecnologia - CTNBio já aprovou mais de 40 liberações planejadas de cana-de-açúcar GM no meio ambiente (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Vários caracteres estão em estudo, tais como resistência a herbicidas e/ou insetos, aumento do teor de sacarose e resistência a estresses abióticos. Essas características apresentam grande potencial de contribuição para o setor sucroalcooleiro, com possíveis impactos benéficos em aspectos econômicos, ambientais e sociais.

A CTNBio, por meio da Resolução Normativa Nº 05 de 12 de Março de 2008 (RN05), dispõe sobre as normas para a liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados - OGMs e seus derivados e, um dos aspectos fundamentais para a avaliação de risco ao meio ambiente, inclui o estudo do fluxo gênico da espécie a ser liberada comercialmente. A RN05 requer informações relativas “à capacidade de dispersão das estruturas de propagação e reprodução do OGM além das áreas de cultivo e os mecanismos de sua dispersão no ar, na água e no solo, fornecendo informações sobre a viabilidade do pólen da planta (...)”. Sabe-se que a cana efetivamente reproduz-se sexualmente em condições ambientais e geográficas específicas, especialmente em baixas latitudes, situações estas encontradas no Nordeste brasileiro. No entanto, é possível, em certas ocasiões, observar o florescimento de alguns híbridos comerciais nas regiões Sudeste e Centro-Oeste e, até hoje, pouco se sabe da efetividade da reprodução sexuada da cana nestas importantes regiões produtoras. A RN05 também requer informações relativas “à área de ocorrência natural de parentes silvestres, existentes em algum ecossistema brasileiro, do mesmo gênero da espécie parental não-modificada”, sobre “a possibilidade de hibridação introgressiva com as espécies sexualmente compatíveis” e sobre “a frequência com que ocorre o cruzamento do organismo parental do OGM, dentro da mesma espécie e com espécies sexualmente compatíveis (...)”.

Referências

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H.M.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; FILGUEIRAS, T.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E. DA SILVA, W.J.; SILVA FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, Berlin, v. 4, n. 1, p. 62–89, 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar. Safra 2012/2013. Terceiro Levantamento**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_p_ortugues_12_2012.pdf. 2012. Acesso em: 15 jan.2015.

2 OBJETIVO

Este trabalho visa gerar subsídios para avaliação de biossegurança sobre o risco de fluxo gênico entre híbridos de cana-de-açúcar convencionais e a espécie selvagem *S. villosum* Steud, a partir da biologia reprodutiva e taxonômica do gênero *Saccharum*.

2.1 Objetivos específicos

Biologia reprodutiva de Saccharum

- ❖ Realizar análises fenológicas da espécie *Saccharum villosum* Steud;
- ❖ Realizar a sexagem de oito híbridos de cana-de-açúcar provenientes da região Centro-Sul do Brasil, através de observação em microscopia de luz (ML);
- ❖ Obter a viabilidade polínica de seis híbridos de cana-de-açúcar e da espécie *S. villosum* afim de determinar a porcentagem de viabilidade do pólen na região Centro-Sul do Brasil e, assim, reunir evidências contrárias ou favoráveis à possibilidade de cruzamentos interespecíficos entre cana-de-açúcar e *Saccharum villosum*.

Morfologia reprodutiva ligada à taxonomia de Saccharum

- ❖ Caracterizar e descrever a morfologia do pólen através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de luz (ML);
- ❖ Descrever o desenvolvimento pós-seminal de *Saccharum villosum*.

3 HIPÓTESES

- ❖ A espécie selvagem *S. villosum* possui sistema reprodutivo alógamo como o encontrado em outras espécies e híbridos do gênero *Saccharum*;
- ❖ A hibridação introgressiva entre a espécie *S. villosum* e os híbridos comerciais não é possível, devido à inviabilidade do pólen da cana-de-açúcar na região Centro-Sul, como mostra a literatura e o saber comum na área.

- ❖ O pólen de *S. villosum* se diferencia morfológicamente dos pólenes de espécies *Saccharum* já estudados anteriormente.
- ❖ O estudo do desenvolvimento pós-seminal de *S. villosum* pode trazer características que diferenciem o gênero *Saccharum* e o gênero *Erianthus* taxonomicamente.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Classificação geral do gênero *Saccharum* L.

4.1.1 Taxonomia do gênero *Saccharum* sp. (LINNAEUS, 1753)

O gênero *Saccharum* foi descrito inicialmente por Linnaeus (1753) no livro *Species Plantarum* se embasando do significado latim da palavra “sugar”. Linnaeus descreve em seu livro as espécies *Saccharum officinarum* L. e *S. spicatum* L., sendo que esta última foi reclassificada para o gênero *Perotis* (*P. spicata* (L.) T. Durand e H. Durand) (DILLON et al., 2007; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

O gênero sempre foi um desafio em relação à sua taxonomia e nomenclatura. Durante vários anos, o gênero continha de cinco a dez espécies do Velho Mundo (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Em 1950, Dutt & Rao sugeriram a reclassificação de *Saccharum*, redistribuindo as espécies para outros gêneros (*Erianthus*, *Narenga* e *Sclerostachya*) e assim, reduzindo-o à cinco espécies: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. robustum*. Mais tarde, Mukherjee (1957) reforçou essa reclassificação propondo o termo “Complexo *Saccharum*” para gêneros *Erianthus* (sect. *Ripidium*), *Miscanthus* (sect. *Diantra*), *Narenga*, *Saccharum* e *Sclerostachya*, alguns gêneros pertencentes à subtribo Saccharinae (DANIELS et al., 1975). Esses gêneros foram considerados importantes na origem evolutiva de *Saccharum*, com base nas características reprodutivas de intercruzamento entre eles (Figura 4.1) (AMALRAJ & BALASUNDARAM, 2006; BARBER, 1920; DANIELS & ROACH, 1987; WATSON & DALLWITZ, 1992).

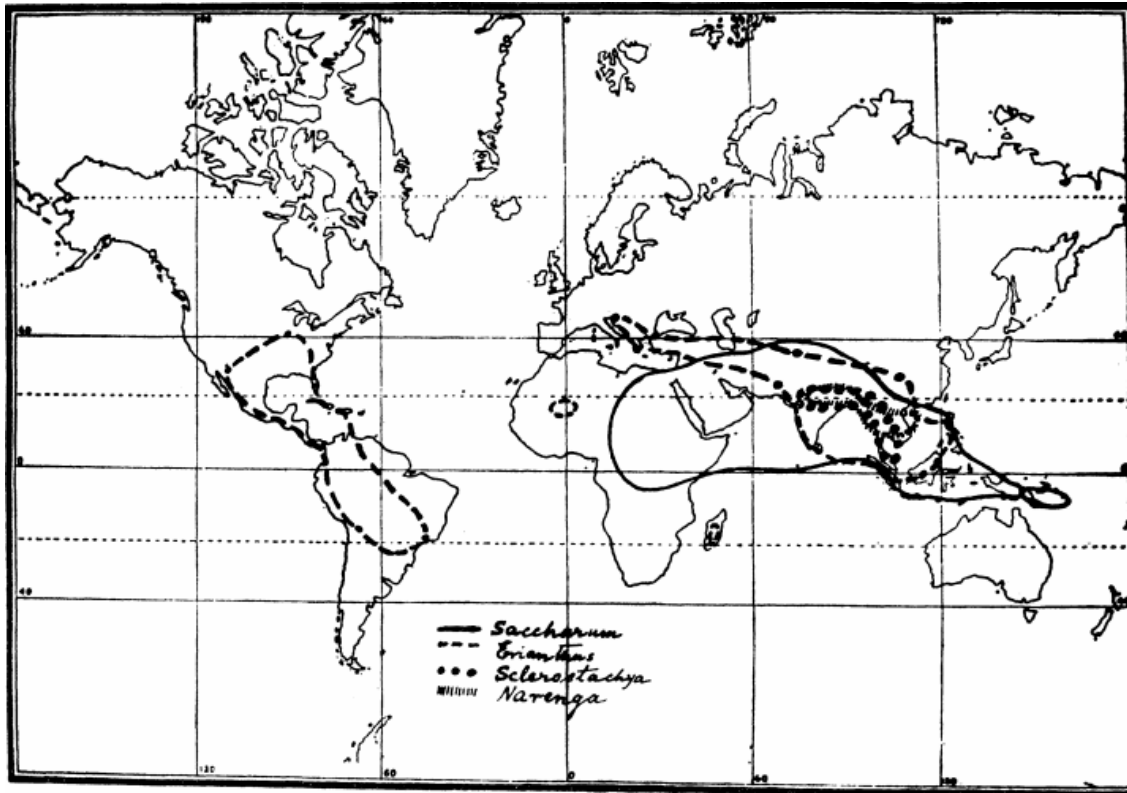


Figura 4.1 - Mapa mostrando a distribuição geográfica de quatro gêneros da subtribo Saccharinae (*Saccharum*, *Erianthus*, *Sclerostachya* e *Narenga*). **Fonte:** Mukherjee (1957)

O comportamento reprodutivo desses gêneros, conjuntamente com suas características morfológicas, tornou-se de fundamental importância para concepção de híbridos e conseqüentemente para as pesquisas de melhoramento com a cana-de-açúcar (MUKHERJEE, 1954 apud AMALRAJ & BALASUNDARAM, 2006).

Erianthus é um gênero intimamente relacionado a *Saccharum* e foi descrito pela primeira vez por Michaux em 1803, o qual descreveu duas espécies no continente americano, *E. saccharoides* e *E. brevibarbis*. As espécies de *Erianthus* na América poderiam ter ocorrido de origem mais recente e assim, isoladas geograficamente ou poderia ter ocorrido de origem politrópica. Mukherjee (1957) demonstrou as diferenças entre *Saccharum* e *Erianthus*, onde a IV gluma de *Saccharum* é reduzida ou ausentes e contém lígula triangular, diferente de *Erianthus* que apresenta lígula arqueada. Atualmente o principal critério para identificar os dois gêneros é a presença (*Erianthus*) ou ausência (*Saccharum*) de uma estrutura floral chamada arista, que é uma extensão da nervura central da bráctea floral, na parte superior do lema. A classificação atual considera que *Erianthus* é sinônimo de *Saccharum* porque o critério comumente utilizado para diferenciar os dois gêneros (presença / ausência de arista no lema) é variável e não pode ser considerada uma característica consistente (BOR, 1960; RENVOIZE,

1984; CLAYTON E RENVOIZE, 1986 apud CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Em contrapartida, vários estudos filogenéticos sugerem que esses táxons devam ser tratados como gêneros independentes (BESSE et al., 1997; HODKINSON et al., 2002; SELVI et al., 2006).

O gênero *Saccharum* L. apresenta ampla distribuição e é encontrado em diversos tipos de paisagens, como florestas, montanhas, desertos e campos, bem como também foram capazes de colonizar ambientes adversos como regiões encharcadas e dotadas de alta salinidade (FILGUEIRAS 1990; 2005).

4.1.2 Centro de Origem

O centro de origem de *Saccharum* L. ainda é muito controverso, mas acredita-se que tenha sido originado na região sudeste da Ásia. Devido à grande concentração do número total de espécies, a Índia é considerada o centro de variação máxima do “Complexo *Saccharum*” (MURHERJEE, 1957).

Acredita-se também que o gênero *Saccharum*, possivelmente, teria se originado antes da divisão de formas e locais dos atuais continentes. O gênero é dividido em dois centros de diversidade: o Velho Mundo (Ásia e África) e no Novo Mundo (América do Norte, Central e do Sul). Na Ásia, ocorrem cerca de 25 espécies nativas, na América do Norte encontram-se seis espécies nativas e cinco introduzidas, e na América Central há três nativas e quatro introduzidas (WEBSTER & SHAW, 1995 apud CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Na África, encontram-se duas espécies nativas e, na Austrália, uma e algumas introduzidas (BONNETT et al., 2008 apud CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Na América do Sul também há a presença das espécies selvagens *S. asperum* (Nees) Steud., *S. angustifolium* (Nees) Trin., *S. purpureum*, *S. biaristatum*, *S. glabrinodis*, *S. clandestinus* e *S. villosum* Steud, Porém, na flora brasileira foram identificadas as espécies *S. villosum*, *S. asperum* e *S. angustifolium*. (FILGUEIRAS & LERINA, 2001; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). A taxonomia do complexo *Saccharum* na América do Sul é muito controversa, pois ainda existe confusão no momento da identificação das espécies, devido a cruzamentos intergenéricos e interespecíficos que provavelmente ocorram, gerando híbridos morfológicamente intermediários (HODKINSON et al., 2002; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

4.1.3 Espécies nativas de *Saccharum* sp. ocorrentes no Brasil

No Brasil, existem três espécies de *Saccharum* L. selvagens (FILGUEIRAS, 2010) que pertenciam ao gênero *Erianthus* por apresentarem aristas nas espiguetas, mas que foram reclassificadas por conterem um lema fértil e apresentarem ambas as espiguetas pediceladas sendo que uma delas apresenta um curto pedúnculo (WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012). As espécies selvagens de *Saccharum* que ocorrem no Brasil são: *S. asperum* (Nees) Steud, *S. angustifolium* (Nees) Trin. e *S. villosum* Steud (FILGUEIRAS & WELKER, 2012).

A espécie *Saccharum asperum* (Nees) Steud pertenceu ao gênero *Erianthus*, espécie *Erianthus asper* Ness var. *brasilianus* (Trin.) Hack. Essa espécie encontra-se distribuída por grande parte da América do Sul, encontrada em países como a Venezuela, Colômbia, Paraguai, Argentina, Uruguai e no Brasil (MOLINA, 1981; FILGUEIRAS & LERINA, 2001; FILGUEIRAS, 2003; WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012). No Brasil a espécie se distribui do estado de Goiás até o Rio Grande do Sul (SMITH et al., 1982; WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012). O habitat da espécie geralmente encontrado são locais banhados e mais raramente em campos úmidos. O florescimento e frutificação costuma ocorrer de Dezembro à Março (WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012).

A espécie pode chegar até a 2,65m de altura. Dentre suas principais características botânicas, destaca-se a presença de nós pilosos, laminas lanceoladas que medem cerca de 22-102 cm x 7-23 mm e lígula 2,5-6mm de comprimento. Suas inflorescências medem de 14-43 cm de comprimento, contem espiguetas sésseis 4-6,5 mm de comprimento. As espiguetas contem a gluma inferior e superior glabras, com presença de aristas de 5-11 mm no lema superior. A ausência de tricomas na gluma inferior pode ser utilizada para identificar a espécie *S. asperum*, pois nas espécies *S. angustifolium* e *S. villosum* ocorre a presença desses tricomas (WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012) como é possível observar na Figura 4.2.

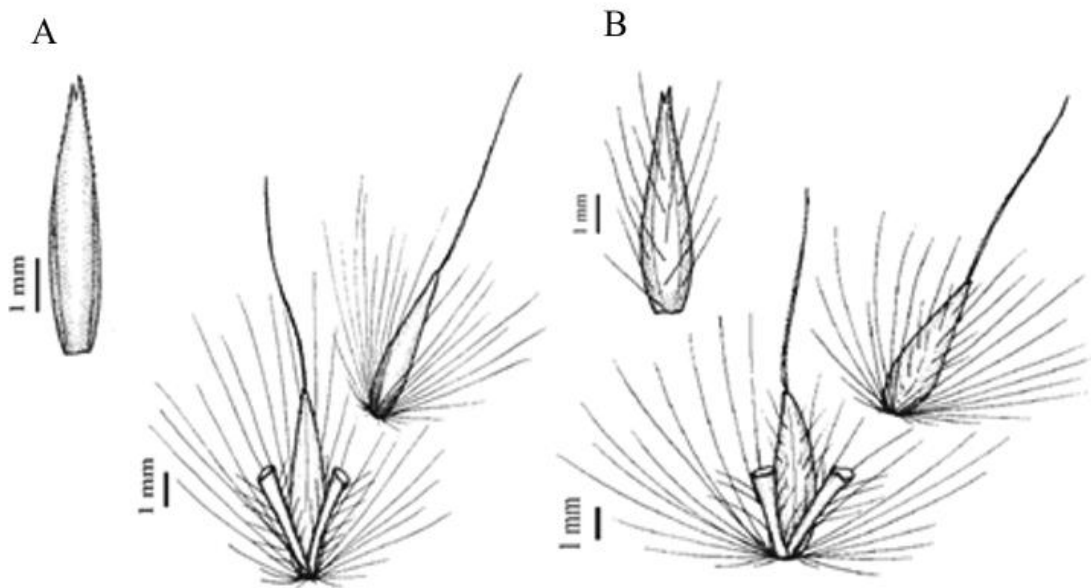


Figura 4.2 - A) Representação da espiguetta sésil de *Saccharum asperum* (Nees) Steud (Longhi-Wagner & Welker 10811) e a gluma inferior com ausência de tricomas. B) Representação da espiguetta sésil de *S. villosum* e *S. angustifolium* com presença de tricomas na gluma inferior. **Fonte:** WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012

A espécie *Saccharum angustifolium* (Nees) Trin. compõem plantas com 95-225 cm de altura com presença de nós glabros. As lâminas são lineares medindo de 22-106 cm x 2-6 mm. Suas inflorescências medem cerca de 13-38 cm de comprimento. As espiguetas são sésseis com 5,5 – 7,3 mm de comprimento. A gluma inferior é densa a esparsamente pilosa, e menos comumente são glabras, na mesma inflorescência; gluma superior densa a esparsamente pilosa ou glabra. A arista localizada no lema superior mede cerca de 7,5 – 15 mm. (FILGUEIRAS & LERINA, 2001; WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012). A espécie também é encontrada em grande parte da América do Sul (Venezuela, Colômbia, Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil (MOLINA, 1981; FILGUEIRAS, 2003; WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012). No Brasil a espécie se encontra entre os estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (SMITH et al., 1982; WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012), porém pode ocorrer em campos secos e muito raramente em campos úmidos (FILGUEIRAS & LERINA, 2001)

Há várias características que coincidem em *S. angustifolium* e *S. villosum*. O que distingue as duas espécies é a largura de suas lâminas foliares: a de *S. angustifolium* mede entre 2-6 mm e a de *S. villosum* mede de 7 até 20 mm. O habitat também pode ser utilizado como critério de distinção entre as duas espécies. *S. villosum* ocorre em ambientes mais pantanosos, enquanto *S. angustifolium* costuma ocorrer em ambientes mais secos (WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012).

Dentre as três espécies de *Saccharum* L. nativas ocorrentes no Brasil, destaca-se *Saccharum villosum* Steud, visto que esta é a espécie largamente encontrada em comparação com as espécies anteriormente citadas. Há relatos desta espécie na América do Sul, com grande destaque para o Brasil, e a espécie também foi encontrada no México, Belize, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Honduras, Suriname, Uruguai e Argentina. No Brasil, a espécie é encontrada nos biomas Cerrado e Mata Atlântica (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Também há relatos de *Saccharum* aff. *villosum*, o que pode indicar a ocorrência de híbridos na espécie (CRIA, 2002).

As plantas apresentam cerca de 115-310 cm de altura; seus nós são pilosos, e as vezes glabrescentes. As lâminas foliares são bem variadas, costumam ser lanceoladas com medidas de 30-115 cm x 7-20 mm, às vezes com lâminas linear-lanceoladas, 35-105 cm x 3-6 mm. Suas inflorescência medem de 20-48 cm comprimento, exserta, menos comumente incluída, na mesma inflorescência. A lema superior apresenta arista com comprimento de 5-14 mm. As espiguetas são pedicelada com 5-7,5 mm de comprimento, a gluma inferior e superior é densa e esparsamente pilosa. A lema superior contém uma arista que pode variar de 6,5-13 mm. (FILGUEIRAS & LERINA, 2001; WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012).

Saccharum villosum Steud é uma espécie com grande potencial para estudo, devido a promissoras contribuições para o melhoramento genético (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; FERNANDES, 2013). Porém, ainda há poucos estudos reprodutivos, como auxílio para futuras pesquisas.

4.2 Reprodução e descrição floral de Cana-de-açúcar (*Saccharum* x *officinarum*)

As espécies de *Saccharum* L. comerciais, a cana-de-açúcar, são amplamente utilizadas para a produção de açúcar e etanol principalmente. A cana-de-açúcar comercializada atualmente é derivada do cruzamento entre várias espécies de *Saccharum* L, predominantemente entre as espécies *S. officinarum* L. e *S. spontaneum* (DILLON et al., 2007).

A inflorescência dos híbridos da cana é uma panícula ramificada de várias pequenas espiguetas sésseis, que formam uma estrutura piramidal. A haste principal é chamada flecha, que é a continuação do último internódio. As espiguetas podem variar de bissexuadas até unissexuadas (VAN DILLEWIJN, 1952; AMARAL et al., 2012) contendo estruturas importantes para a dispersão das sementes denominada de tricomas. As espiguetas são compostas de um androceu com três estames e um gineceu com um ovário e dois estigmas com coloração de vermelha a arroxeada (BLACKBURN, 1984; AMARAL et al., 2012). É observado

o fenômeno de protoginia, quando o gineceu amadurece anteriormente ao androceu, facilitando a fecundação cruzada. O amadurecimento não ocorre homoganeamente, ocorre do ápice para a base, portanto a dispersão polínica também é nesse sentido (AMARAL et al., 2012). O fruto é unicarpelar e a propagação das sementes ocorre através do vento, o que facilita a dispersão das espécies de *Saccharum* sp. (RAWITSCHER, 1953).

O florescimento dos híbridos da cana-de-açúcar é regulado pelo fotoperíodo, ou seja, a indução e o desenvolvimento da floração ocorre quando as horas de luz diárias diminuem e a emergência da panícula ocorre quando se atinge 11 h de luz. Nas condições, do hemisfério sul, o florescimento ocorre próximo do equinócio do outono e diminui o grau de indução, a medida que, aumenta os graus de latitude (BRETT, 1951; MOORE & NUSS, 1987; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; AMARAL et al., 2012).

A umidade do solo adequada e temperaturas superiores a 18° C também são necessárias para a indução do florescimento (BARBIERI et al., 1984; COLEMAN, 1969; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). As temperaturas consideradas ideais para o desenvolvimento da panícula e para a fertilidade do pólen são de 28° C durante o dia e 23° C durante a noite. Temperaturas abaixo de 23° C atrasam o desenvolvimento da panícula e reduzem a fertilidade do pólen (BERDING, 1981; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). A viabilidade do pólen pode ser prejudicada com temperaturas diurnas superiores a 31° C e noturnas abaixo de 18° C (CLEMENTS & AWADA, 1967; MOORE & NUSS, 1987; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

O pólen dos híbridos de cana-de-açúcar é pequeno, e apresenta meia-vida de aproximadamente 12 min. pela razão de perderem umidade rapidamente após a deiscência. Em contrapartida, dispersam por grandes distâncias (VENKATRAMAN, 1922; MOORE, 1976; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

4.3 Estudos morfológicos como subsídios para pesquisas taxonômicas

4.3.1 Estudos morfológicos para identificar gêneros e espécies

O objetivo essencial de estudos morfológicos de flores, pólen, frutos e sementes é solucionar problemas taxonômicos de diversas famílias de plantas (TORRES, 1986). Na taxonomia, os estudos morfológicos podem ser utilizados para identificar e classificar filogeneticamente os táxons.

Vários estudos morfológicos já tem sido realizados com o objetivo de contribuir com a taxonomia da família Poaceae (TATEOKA et al., 1959; ELLIS, 1976; 1979; ZULOAGA et al.,

1998; DE OLIVEIRA et al., 2008). E mais recentemente com espécies de *Saccharum* brasileiras (FERNANDES, 2013).

4.3.2 Análise de desenvolvimento pós-seminal como auxílio à taxonomia de *Saccharum* sp.

As análises de desenvolvimento pós-seminal têm se tornado importante ferramenta para esclarecer dúvidas taxonômicas, pois proporcionam uma filogenia robusta, principalmente nas monocotiledôneas (TILLICH, 2000; NAKAMURA & SCATENA, 2009). Nas gramíneas, a nomenclatura das estruturas emergentes do embrião em desenvolvimento é peculiar. O embrião ocupa posição periférica em relação ao endosperma. Essa característica é frequente e já é considerada sinapomórfica para a família Poaceae (GPWG, 2001). A radícula é homóloga à coleorriza, o coleóptilo à lígula da folha cotiledonar (escutelo) e o epiblasto à bainha do cotilédone (COCUCCI & ASTEGIANO, 1978). A raiz primária nas gramíneas é reduzida, portanto a característica é considerada um caráter derivado em relação às outras famílias (BOYD, 1932; TILLICH, 2007).

Nakamura & Scatena (2009) realizaram um trabalho morfológico com o objetivo de encontrar padrões de desenvolvimento na família Poaceae e compará-la com espécies de monocotiledôneas previamente estudadas. Dentre as espécies estudadas estão: *Olyra humilis* Nees (Bambusoideae) considerada uma espécie basal; *Axonopus aureus* P. Beauv. e *Paspalum polyphyllum* Nees ex Trin. (Panicoideae) consideradas intermediárias; *Chloris elata* Nees e *Eragrostis solida* Desv. (Chloridoideae) consideradas derivadas (GPWG, 2001). Os autores encontraram sementes albuminosas em todas as espécies, com embrião diferenciado e lateral, e concluíram também que há homologias entre os representantes de Poaceae estudados e as monocotiledôneas previamente estudadas. Uma das relações é a protrusão sequencial da coleorriza, coleóptilo e plúmula. A emissão de catafilos (primeira folha com bainha alongada e limbo foliar reduzido) ocorreu apenas na espécie *Olyra humilis*, uma espécie considerada basal. Mas a raiz primária reduzida, denominada coleorriza, pode ser considerada um caráter derivado dentro de Poaceae.

Como pode ser destacado, o gênero *Erianthus* está intimamente relacionado ao gênero *Saccharum*, e há confusão na reclassificação vigente de *S. villosum*. Reeder (1957) realizou análises do desenvolvimento pós-seminal com o gênero *Erianthus*. No desenvolvimento de *Erianthus*, foram listadas quatro características importantes para a sistemática e para o agrupamento natural dos gêneros da família, como a presença ou ausência de fenda no escutelo;

presença ou ausência de epiblasto; vascularização, presença de folha plumular, sendo possível observar nos embriões de *Erianthus* a presença de fenda no escutelo, vascularização e folha plumular, e ausência de epiblasto (excrescência da coleorriza, oposta ao escutelo).

4.3.3 Estudos morfológicos em grãos de pólen de *Saccharum* sp.

Os grãos de pólen são estruturas extremamente importantes na reprodução vegetal. É o gametófito masculino, portador do gameta masculino, capaz de efetuar a fecundação entre indivíduos ou entre espécies ou gêneros, e até mesmo participar da autofecundação. A caracterização morfológica dos grãos de pólen de *Saccharum* sp. pode oferecer dados importantes para a taxonomia e o melhoramento genético do gênero (como macho-esterilidade, por exemplo) e pode fornecer dados relevantes para a viabilidade de cruzamentos interespecíficos dentro do gênero, relacionados à possibilidade de ocorrer fluxo gênico entre duas espécies (CESNIK & MIOCQUE, 2004).

Saccharum pertence à família Poaceae, que é estenopolínica, ou seja, os grãos de pólen dentro ad família não teriam diferenças entre si (CHATURVEDI & DATTA, 2001). Porém, estudos com diferentes espécies de Poaceae refutam essa teoria, demonstrando que a família apresenta ornamentação da exina distinta em diferentes casos e que essa variável é importante na taxonomia e no entendimento dos intercruzamentos entre indivíduos de espécies distintas principalmente entre cultivadas e silvestres (CHATURVEDI et al., 1994; 1998). Estudos de palinologia com diferentes espécies da família Poaceae revelam que os grãos de pólen apresentam tamanhos médios de 25 a 50 μm de diâmetro, abertura monoporada e a ornamentação da exina é microrreticulada. Porém, Radaeski et al. (2013) encontraram variação nas medidas das aberturas dos poros e ânulos entre as diferentes espécies, de 2,5 a 9 μm e de 5 a 20 μm , respectivamente. Na cultivar Basmati de *Oryza sativa* (arroz) foi estudada a ultraestrutura da superfície da exina. O pólen de arroz é monoporado, anelado, com exina dotada de espículas espaçadas. A variedade vem sendo utilizada há muito tempo e cultivada em diferentes regiões ecogeográficas, e isso gerou algumas diferenças pontuais na micromorfologia da exina, refletindo em características de utilidade taxonômica (DATTA & CHATURVEDI, 2004).

Alguns estudos sobre a morfologia do pólen de cana-de-açúcar são encontrados na literatura. Um dos primeiros estudos realizados com morfologia do pólen de *Saccharum* ocorreu em 1975, com microscopia eletrônica de varredura (WATSON & BELL, 1975). Krishnamurthi (1980), realizou experimentos com grãos de pólen de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), também

com microscopia eletrônica de varredura. O autor relatou que os grãos de pólen de *Saccharum* sp. são monoporados e sua exina é dotada de espículas agrupadas de forma irregular, separadas por fissuras estreitas (RAE et al., 2014).

A morfologia polínica de quatro espécies de *Saccharum* foi estudada por Chaturvedi & Datta (2001); eles utilizaram duas espécies cultivadas (*S. officinarum* e *S. sinense*) e duas selvagens (*S. robustum* e *S. spontaneum*) em observações com Microscopia de luz (ML) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Eles descreveram diferenças nos padrões da superfície da exina e encontraram padrões de importância taxonômica. Nas quatro espécies estudadas, os grãos de pólen são monoporados anelados, característicos da família Poaceae. Porém, houve variação na ornamentação da exina entre as quatro espécies de *Saccharum* sp. *S. officinarum*, adaptada para condições tropicais, se caracteriza por conter a superfície da exina granulosa com os grânulos dispostos em grupos. *S. sinense*, espécie de condições subtropicais e temperadas, e outras espécies cultivadas têm o padrão de exina tuberculada-baculada. As espécies selvagens estudadas têm o padrão de exina insular coberta por espículas arredondadas. *S. robustum* forma um padrão de mosaico e, em *S. spontaneum*, as espículas são esparsas. *S. robustum* é considerada próxima evolutivamente de *S. spontaneum* e, portanto, é previsível que apresentem uma característica em comum, a saber, a exina com a superfície insular. Quanto ao tamanho dos grãos de pólen, os autores concluíram que *S. robustum* e *S. officinarum*, dos quais, supostamente, o primeiro teria dado origem ao segundo (MUKHERJEE, 1957) têm tamanho maior (*S. robustum* $\mu=45\mu\text{m}$ e *S. officinarum* $\mu=46,5\mu\text{m}$) em relação a *S. sinense* ($\mu=42\mu\text{m}$) e *S. spontaneum* ($\mu=36\mu\text{m}$). O diâmetro dos poros também variou decrescentemente de acordo com o tamanho dos grãos de pólen.

Portanto, é recomendável o conhecimento das estruturas reprodutivas masculinas de *S. villosum* como auxílio à taxonomia e das informações relevantes que serão necessárias para os estudos futuros com cruzamentos artificiais interespecíficos. Entre as características de importância relativas ao pólen, estão aquelas acerca da viabilidade polínica.

4.4 Estudos morfológicos como subsídios para pesquisas com fluxo gênico

4.4.1 Estudos de viabilidade polínica de *Saccharum* sp.

Uma etapa essencial para a realização de cruzamentos interespecíficos é o conhecimento básico da viabilidade polínica (DE SOUZA, 2013). A viabilidade polínica é a medição da fertilidade masculina, e pode ser determinada por diferentes técnicas em *Saccharum* sp., como pela indução da fertilização *in vitro* com um método adaptado de Krishnamurthi (1977) e através de técnicas de coloração citológicas.

A formação do pólen da cana-de-açúcar se inicia com o desenvolvimento dos estratos parietais da antera, juntamente com a divisão meiótica. O pólen é muito sensível e apresenta meia-vida de 12 minutos após a dispersão pelo vento, sendo que a viabilidade é perdida após cerca de 35 minutos (SCARPARI & BEAUCLAIR, 2008). Como visto anteriormente, os grãos de pólen também são sensíveis à umidade e à temperatura a que estão expostos, sendo que seu grau de deiscência está relacionado ao seu genótipo (OLIVEIRA, 2007).

Em regiões de maiores latitudes, a floração inconstante e a inviabilidade do pólen é um problema para a realização de cruzamentos ou para os programas de melhoramento genético (BERDING, 1981). A umidade está intimamente relacionada à viabilidade dos grãos de pólen de *Saccharum* sp., e esta se mantém alta com umidade acima de 67%, a máxima taxa de germinação exigindo umidade relativa do ar acima de 85%.

A viabilidade polínica é essencial para a realização de cruzamentos em programas de melhoramento genético, como também nas análises de fluxo gênico entre espécies diferentes. Há um número restrito de estudos acerca da viabilidade do pólen em *Saccharum* sp., sendo sua maioria com cana-de-açúcar na região nordeste do Brasil (MELLONI, 2012) e não esclarecendo se essa viabilidade polínica é reproduzida nas condições do centro-sul do Brasil, o que poderia oferecer risco para os parentes selvagens existentes nas proximidades das cultivares. Concomitantemente, também não há estudos sobre a viabilidade polínica dos parentais selvagens do Brasil da cana-de-açúcar, como é o caso de *S. villosum*. Os híbridos entre a cana e os parentes selvagens podem vir a competir por recursos ecológicos com os seus parentais selvagens na natureza.

4.4.2 Estudos sobre sexagem

A realização de sexagem determina se uma determinada espécie é bissexuada (hermafrodita) ou unissexuada (feminina ou masculina) de acordo com a observação de suas espiguetas. A determinação da sexualidade da planta fornece informações determinantes no momento de analisar os possíveis vetores do fluxo gênico entre uma planta e outra, desde que as espécies sejam alógamas ou mistas. A cana-de-açúcar (*Saccharum x officinarum*) é considerada tipicamente hermafrodita, porém híbridos da cultura podem possuir flores femininas ou masculinas, com pólen viável ou não, dependendo da região de cultivo. A realização de sexagem chama a atenção para a possibilidade de cruzamentos e de fluxo gênico entre os híbridos comerciais de cana-de-açúcar e *S. villosum*, o que tem relação com a receptividade dos estigmas e à viabilidade de seus grãos de pólen (GEPTS & PAPA, 2003).

4.4.3 Estudos de fenologia e distribuição geográfica

A fenologia é o estudo do ciclo de vida de plantas ou animais ao longo de determinado tempo, com o objetivo de compreender os padrões reprodutivos e vegetativos de determinada espécie (MORELLATO, 1995). O ciclo de vida nas plantas em geral depende de como determinada espécie é capaz de responder ao meio ambiente, portanto envolve as variáveis meteorológicas e a influência do tempo. Para estudar a fenologia, é necessário o conhecimento das características morfológicas e anatômicas da espécie (BONNETT, 2014), assim como sua distribuição geográfica. As principais características fenológicas são as relacionadas a alterações de tamanho, e ao surgimento de características vegetativas e reprodutivas. A história de vida é determinada por estágios de desenvolvimento como: embriogênese, desenvolvimento vegetativo e desenvolvimento reprodutivo. A descrição do desenvolvimento da planta em sua totalidade permite o reconhecimento e garante rendimentos maiores para sua utilização, tanto com plantas cultivadas, como com plantas nativas utilizadas para restauração de áreas degradadas, por exemplo, ou para estudos de fluxo gênico (LARGE, 1954; NEWMAN & BEARD, 1962; TOTTMAN & BROAD, 1987; BONNETT, 2014).

O comportamento fenológico reprodutivo de *Saccharum* sp. é amplamente influenciado por fatores climáticos como temperatura, luz e umidade, que são os principais fatores que alteram seu crescimento e florescimento. A inflorescência de *Saccharum* sp. é uma panícula aberta, e em cana-de-açúcar também é conhecida como bandeira ou flecha (ARALDI et al., 2010; MOZAMBANI et al., 2006). A espécie se propaga vegetativamente, e a maioria dos estudos com a cana-de-açúcar é realizada a partir desse tipo de reprodução, enquanto que o desenvolvimento floral da cultura não é desejável. A propagação se dá a partir de gemas vegetativas ou através de perfilhos a partir das gemas axilares já existentes (BREAUX & MILLER, 1987). O desenvolvimento das inflorescências depende de estímulos para as diferenciações meristemáticas, como o fotoperíodo, temperatura, latitude, umidade e os nutrientes disponíveis (MOZAMBANI et al., 2006). Na cana-de-açúcar (*S. x officinarum*), as diferenciações ocorrem nos meses de fevereiro a abril, com florescimento de abril a junho na região Centro-Sul do Brasil (HUMBERT, 1974). Os fatores ambientais que levam à floração na cana-de-açúcar são extremamente complexos (RAE et al., 2014). O florescimento é melhor nas regiões equatoriais, pois lá ocorre fotoperíodo de 12 horas e temperaturas mais constantes, sendo as latitudes maiores menos propícias para o florescimento da cana-de-açúcar (BERDING, 1981). A umidade está relacionada intimamente à adequada formação das panículas, garantindo

assim, a antese e a produção de sementes. A água é um agente transportador dos fotoassimilados para a panícula, por isso a abertura das flores é afetada pela umidade do ar, sendo influenciada por fenômenos que ocorrem horas antes do amanhecer, quando a umidade do ar é alta e a planta encontra-se totalmente hidratada (MOORE & NUSS, 1987). Na região Centro-Sul do Brasil, há diversos híbridos da cultura e o florescimento é variável devido ao fotoperíodo e a temperaturas amplamente oscilantes que prejudicam a intensidade do florescimento (GOSNELL, 1973; NUSS & BRETT, 1977 apud MELLONI, 2012).

O comportamento reprodutivo dos parentes selvagens pode ser determinado a partir da análise de três possibilidades: a planta pode ser predominantemente autopolinizada (autógama), pode ter polinização cruzada (alógama) ou ainda ser uma planta de sistema misto, com taxas de cruzamento intermediárias. A diferença entre os sistemas está relacionada com a flexibilidade estrutural genética quando há alogamia na espécie. A alogamia permite que as plantas consigam se adaptar de forma mais eficiente às mudanças. (ALLARD, 1971; MENDES, 2013). A possibilidade de fluxo gênico está ligada também a sincronização do florescimento entre as plantas com possibilidade geográfica de cruzamento. Assim, são fundamentais as análises das épocas de florescimento e do comportamento observado nos vários períodos do ano (GEPTS & PAPA, 2003).

O comportamento reprodutivo pode influenciar a capacidade de expansão geográfica do material genético e a capacidade de se adaptar a novos *habitat*. A distribuição geográfica de *S. villosum* foi retirada de duas fontes (CRIA, 2002; GrassWorld), as quais não são equivalentes (Figura 4.3).

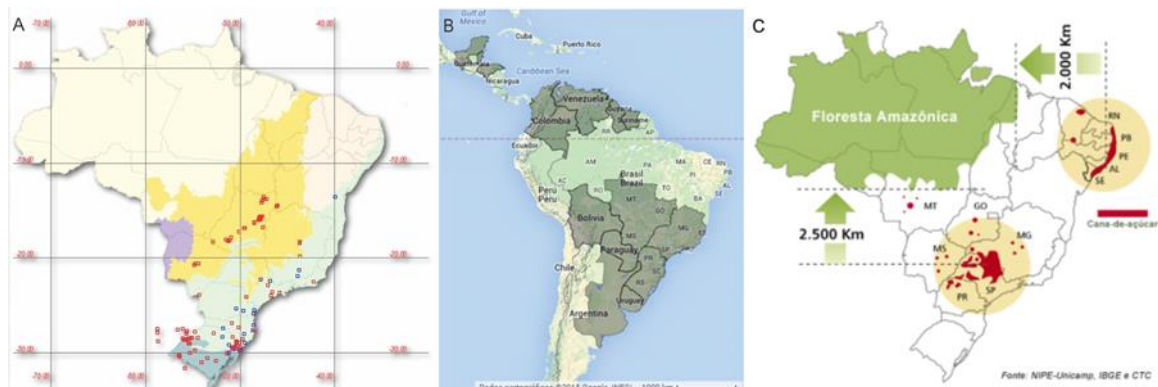


Figura 4.3 – Distribuição da espécie *S. villosum* no Brasil e no mundo. A) Distribuição da espécie *S. villosum* no território brasileiro emitida pela rede SpeciesLink (<http://www.splink.org.br/>) (CRIA, 2002). Os pontos vermelhos e azuis correspondem às coordenadas geográficas dos pontos de coleta realizados pelos herbários, floras e estudos dirigidos ao tema. Os pontos vermelhos são as coordenadas geográficas dos locais originais e os pontos azuis são as coordenadas geográficas dos municípios de coleta. As cores no mapa representam os biomas. Amarelo claro representa o bioma Amazônia; amarelo escuro representa o bioma Cerrado; rosa claro representa o bioma Caatinga; verde claro representa o bioma Mata Atlântica; verde escuro representa o bioma Pampas; e a cor roxa representa

o bioma Pantanal. B) Distribuição da espécie *S. villosum* no âmbito global emitida pelo sistema de informação online GrassWorld. As áreas em verde escuro representam os locais de incidência de *S. villosum* em visão geral. C) Distribuição geográfica das localizações dos plantios de cana-de-açúcar no Brasil. Em vermelho: representação das áreas de plantio

Os dados são originários de floras, herbários e de estudos dirigidos ao gênero, em que a coleta não foi sistemática. Portanto, é possível observar algumas lacunas nos mapas. De acordo com as figuras 4.3 A, B, os pontos representados são ocorrências documentadas da espécie. Através da sobreposição dos mapas, analisando apenas o território brasileiro, os estados do Mato Grosso e do Espírito Santo não são compatíveis. Nenhum dos estados é uma microrregião de cultivo de cana-de-açúcar. Considerando as principais regiões de cultivo, a ocorrência de *S. villosum* se restringe ao Centro-Sul e não apresenta risco de fluxo gênico na região Nordeste (Figura 4.3 C).

S. villosum pode ocorrer nas mesmas microrregiões de plantio de cana-de-açúcar e em habitat compatíveis (Figura 4.3). A distribuição espacial das populações selvagens e da cultura de cana-de-açúcar (*S. x officinarum*), mesmo não sendo totalmente sobreposta hoje, é dinâmica e pode vir a pô-las em contato ao longo do tempo. Para que não seja possível ocorrer fluxo gênico entre as populações selvagens e os híbridos de cana-de-açúcar, será necessário entender vários fatores da ecologia e da biologia reprodutiva do parente selvagem (GEPTS & PAPA, 2003).

Referências

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Rio de Janeiro: Edgard Blucher, 1971. 381p.

ALMARAJ, V. A.; BALASUNDARAM, N. On the taxonomy of the members of 'Saccharum complex'. **Genetic Resource and Crop Evolution**, Berlin, v. 53, n. 1, p. 35-41, 2006.

AMARAL, A. L.; SANTOS, J. M.; CÂMARA, T. M. M.; BARBOSA, G.V. S. **Metodologia de Conservação de Pólen de Cana-de-açúcar**, Aracajú, SE, p. 1-11, 2012. (EMBRAPA Comunicado Técnico 127).

ARALDI, R.; SILVA, F. M. L.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Florescimento em cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 40, n. 3, p. 694-702, 2010.

BARBER, C. A. The origin of sugarcane. **International Sugar Journal**, London, v. 22, p. 249-251, 1920.

BARBIERI, J. L.; POLI, D. M.; DONZELLE, J. L. Compactação e descompactação de solo em áreas de reforma de canaviais. **Boletim Técnico Coopersugar**, São Paulo, v.25, p. 14-20, 1984.

BERDING, N. Improved flowering and pollen fertility in sugarcane under increased night temperatures. **Crop Science**, Madison, v. 21, p. 863-867, 1981.

BESSE, P.; MCINTYRE, C. L.; BERDING, N. Characterisation of *Erianthus* sect. *Ripidium* and *Saccharum* germplasm (Andropogoneae-Saccharinae) using RFLP markers. **Euphytica**, Berlin, v. 93, n. 3, p. 283-292, 1997.

BLACKBURN, F. **Sugarcane**. England: Longman House, 1984. 414p.

BONNETT, G. D.; Developmental Stages (Phenology) In. MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Ed.). **Sugarcane: Physiology, Biochemistry & Functional Biology**. New Jersey, US: John Wiley & Sons, 2014. p. 35-50.

BONNETT, G. D.; NOWAK, E.; OLIVARES-VILLEGAS, J. J.; BERDING, N.; MORGAN, T.; AITKEN, K.S. Identifying the risks of transgene escape from sugarcane crops to related species, with particular reference to *Saccharum spontaneum* L. in Australia. **Tropical Plant Biology**, v.1, p. 58-71, 2008.

BOR, N. L. **The grasses of Burma, Ceylan, India and Pakistan (excluding Bambuseae)**. New York, NY: Pergamon, 1960. 767p.

BOYD, L. Monocotylous seedling: morphological studies in the post-seminal development of the embryo. **Transaction and Proceedings/Botanical Society of Edinburgh**, Edinburgh, UK, v. 31, p. 1-224, 1932.

BREAUX, R. D.; MILLER, J. D. Seed handling, germination and seedling propagation. In: HEINZ, D. J. **Sugarcane Improvement through Breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. 603p.

BRETT, P. G. C. Flowering and pollen fertility in relation to sugarcane breeding in Natal. In: CONGRESS PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 1951, Brisbane. **Congress Proceedings of International Society of Sugarcane Technologists**, v. 7, p. 43-56, 1951.

CRIA - Centro de Referências em Informação Ambiental. *Saccharum villosum* Steud. **SpeciesLink**. 2002. Disponível em: <http://splink.cria.org.br/>. Acesso em: 26 abr. 2015.

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

CHATURVEDI, M.; DATTA, K. Pollen morphology in *Saccharum* L. (poaceae) —wild and cultivated sugar cane species: With one figure and one table. **Feddes Repertorium**, New Jersey, US, v. 112, n. 5-6, p. 387-390, 2001.

CHATURVEDI, M.; DATA, K.; NAIR, P.K.K. Pollen morphology of *Oryza* (Poaceae). **Grana**, Abingdon, UK, v. 37, p. 79-86, 1998.

CHATURVEDI, M.; YUNUS, D.; DATA, K. Pollen morphology of *Sorghum* MOENCH – sections *Eu-sorghum* and *Para-sorghum*. **Grana**, Abingdon, v. 33, p. 117-123, 1994.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, C.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA,

A. V. O.; FILGUEIRAS, T. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; DA SILVA, W. J.; SILVA FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, Berlin, v. 4, n. 1, p. 62–89, 2011.

CLAYTON, W. D; RENVOIZE, S. A. **Genera Graminum: Grass of the world**. London, UK: Her Majesty's Stationery Office, 1986. 389p.

CLEMENTS, H. F.; AWADA, M. Experiments on the artificial induction of flowering in sugarcane. In: CONGRESS PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 1967, Taipei. **Congress Proceedings of International Society of Sugarcane Technologists**, v. 12, 1967. p. 795-812.

COCUCCI, A. E.; ASTEGIANO, M. E. Interpretacion del embrion de las Poáceas. **Kurtziana**, Cordoba, AR, v. 11, p. 41-54, 1978.

COLEMAN, R. E. Physiology of flowering in sugarcane. In: 13th CONGRESS TAIWAN, 1968, Taiwan, CN. **The International Society of Sugarcane Technologists**, p. 992-1000, 1969.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (Org.). **Sugarcane Improvement through Breeding**. New York: Elsevier Science Publishers, 1987. p. 7-84.

DANIELS, J.; SMITH, P.; PATON, N.; WILLIAMS, C. A. The origin of the genus *Saccharum*. **Sugarcane Breeding Newsletter**, Brisbane, v. 36, p. 24-39, 1975.

DATTA, K.; CHATURVEDI, M. Pollen morphology of Basmati cultivars (*Oryza sativa* race Indica) – exine surface ultrastructure. **Grana**, Abingdon, v. 43, n. 2, p. 89-93, 2004.

DE OLIVEIRA, R. P.; LONGHI-WAGNER, H. M.; LEITE, K. R. B. A contribuição da anatomia foliar para a taxonomia de *Raddia* Bertol. (Poaceae: Bambusoideae). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 22, n. 1, p. 1-19, 2008.

DE SOUZA, E. H. **Reprodução e hibridação interespecífica e intergenérica em bromeliáceas com potencial ornamental**. 2013. 256 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2013.

DILLON, S. L.; SHAPTER, F. M.; HENRY, R. J.; CORDEIRO, G.; IZQUIERDO, L.; LEE, S. Domestication to crop improvement: genetic resources for *Sorghum* and *Saccharum* (Andropogonae). **Annals of Botany**, Oxford, UK, v. 100, p. 975-989, 2007.

DUTT, N. L.; RAO, J. T. The present taxonomic position of *Saccharum* and its congeners. In: 7th CONGRESS PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 1950, Brisbane. **Congress Proceedings of International Society of Sugarcane Technologists**, v. 7, p. 287-293, 1950.

ELLIS, R. P. A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. I. The leaf-blade as viewed in transverse section. **Bothalia**, Durbanville, ZA, v. 12, p. 65-409, 1976.

_____. _____. II. The epidermis as seen in surface view. **Bothalia**, Durbanville, ZA, v. 12, n. 4, p. 641-671, 1979.

FERNANDES, S. D. C. **Caracterização estrutural e bioquímica do colmo das espécies brasileiras do gênero *Saccharum* L. (POACEAE)**. 2013. 106 p. Tese (Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

FILGUEIRAS, T.S. Desertificação em Gilbués, Piauí; uma análise agrostológica. **Caderno de Geociências**, Salvador, BA, v. 7, n.1, p. 23-27, 1990.

_____. *Saccharum* L. In: ZULOAGA, F.O.; MORRONE, O.; DAVIDSE, G.; FILGUEIRAS, T.S.; PETERSON, P.M.; SORENG, R.J.; JUDZIEWICZ, E.J. **Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae and Danthoioideae**. Washington, DC: National Museum of natural history, 2003. p. 550-557.

_____. Mar de capins: gramíneas em Cafuringa. Brasília, DF: Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. 2005. p. 141-146.

_____. *Saccharum* L. In: FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A.; CARVALHO JÚNIOR, A. A. de; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; DA COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; DE LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.; PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V. C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 1512.

FILGUEIRAS, T.S.; LERINA, R. *Saccharum* L. In: WANDERLEY, M. D. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo, SP: FAPESP, 2001. p. 108-110.

FILGUEIRAS, T. S.; WELKER, C. A. D. *Saccharum*. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 02 out. 2014.

GEPTS, P; PAPA, R. Possible effects of (trans) gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. **Environmental biosafety research**, Les Ulis, v. 2, n. 02, p. 89-103, 2003.

GOSNELL, J. M. Some factors affecting flowering in sugarcane. **Proceeding of the South African Sugarcane Technologist Assosiation**, Mauritius, v.47, p.144–147, 1973.

GPWG - Grass Phylogeny Working Group. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 88 n.3, p. 373-457, 2001.

GRASSWORLD. *Saccharum villosum*. **GrassWorld**. 2012. Disponível em: <http://grassworld.myspecies.info/>. Acesso em: 21/09/2014.

HODKINSON, T. R.; CHASE, M. W.; LLEDÓ, M. D.; SALAMIN, N.; RENVOIZE, S. A. Phylogenetics of *Miscanthus*, *Saccharum* and related genera (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacer. **Journal of Plant Research**. Berlin, v. 115, p. 381-392, 2002.

HUMBERT, R.P. **El cultivo de la caña de azúcar**. México: Compañía Editorial Continental, 1974. 719p.

KRISHNAMURTHI, M. The sugarcane pollen. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 1977, São Paulo. **ISSCT Impress**, São Paulo, SP, v. 16, p. 157-164. 1977.

_____. Further studies on sugarcane pollen. CONGRESS PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, Manila, PH. Congress Proceedings of International Society of Sugarcane Technologists. Manila, PH, p. 1204-1206, 1980.

LARGE, E. C. Growth stages in cereals illustration of the Feekes scale. **Plant Pathology**, New Jersey, US, v. 3, p. 128-129, 1954.

LINNAEUS, C. *Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*. **Holmiae, Impensis Laurentii Salvii. [L. Salvius, Stockholm.]**, 1753.

MELLONI, M. L. G. **Fisiologia do florescimento e viabilidade do grão-de-pólen da cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*)**. 2012. 80p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

MENDES, A. D. R.; MARTINS, E. R.; FIGUEIREDO, L. S. Estudo do sistema de reprodução da fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 4, p. 607-608, 2013.

MICHAUX, A. *Florae Boreali-americanae*. Paris: Tom 2, 1803. 205 p.

MOLINA, A. M. El género *Erianthus* (Gramineae) en la Argentina y países limítrofes. **Darwiniana**, Buenos Aires, v. 23, p. 559-585, 1981.

MOORE, P. H. Studies on sugarcane pollen. II. Pollen storage. **Phyton**, Argentina, v. 34, p. 71-80, 1976.

MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. **Sugarcane: Physiology, Biochemistry & Functional Biology**. New Jersey, US: John Wiley & Sons, 2014.

MOORE, P. H.; NUSS, K. J. Flowering and flower synchronization. In: HEINZ, D. J. (Org.). **Developments in Crop Science II: Sugarcane Improvement through Breeding**. (Sine loco): Elsevier, 1987. p. 273-311.

MORELLATO, L. P. C. As estações do ano na floresta. In: LEITÃO FILHO, H. F.; MORELLATO, L. P. C. (Org.). **Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra**. Campinas, SP: UNICAMP, 1995. p.187-192.

MOZAMBANI, A. E.; PINTO, A. S.; VANZOLINI, S.; MATTIUZ, C. F. M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, SP: Cadernos Planalsucar, 2006. p. 11-18.

MUKHERJEE S. K. Revision of the genus *Saccharum*. Bull. **Botanical Society of Bengal**. Calcutta, IN, v. 8, p. 143-148, 1954.

_____. Origin and Distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette**, Chicago, US, v. 119, n.1, p. 55-61, 1957.

NAKAMURA, A. T.; SCATENA, V. L. Desenvolvimento pós-seminal de espécies de Poaceae (Poales). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, MG, v. 23, n. 1, p. 212-222, 2009.

NEWMAN, J. E.; BEARD, J. B. Phenological observations: the dependent variable in bioclimatic and agrometeorological studies. **Agronomy Journal**, Madison, v. 54, p. 399-403, 1962.

NUSS, K. J.; BRETT, P. G. C. Artificial induction of flowering in a sugarcane breeding programme. **Proceedings South African Genetic Society**, Cape Town, ZA, v. 6, p. 54-64, 1977.

OLIVEIRA, J. F. **Viabilidade polínica e propagação *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). 73p. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Alagoas, Rio Largo, 2007.

RADAESKI, J. N.; PEREIRA, A. B.; BAUERMANN, S. G. Morfologia polínica de espécies da família Poaceae com ocorrência no Rio Grande do Sul, Brasil. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO (SIEPE), Bagé, RS. **Anais...** Bagé, RS: (SIEPE). v.5, n.4, 2013.

RAE, A. L.; MARTINELLI, A. P.; DORNELA, M. C. Anatomy and Morphology. In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Org.). **Sugarcane: Physiology, Biochemistry & Functional Biology**. New Jersey, US: John Wiley & Sons, 2014. p. 19-33.

RAWITSCHER, F. **Elementos Básicos de Botânica**. 3. ed. São Paulo, SP: Edições Melhoramentos, 1953. 382p.

REEDER, J. R. The embryo in grass systematics. **American Journal of Botany**, New York, NY, v. 44, p. 756-768, 1957.

RENVOIZE, S. A. **The grasses of Bahia**. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, 1984. 301p.

SCARPARI, M. S.; DE BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e Botânica. In: DINARDO MIRANDA, L. L.; DE VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas, SP: Instituto Agronômico, 2008. p. 47-56.

SELVI, A.; NAIR, N. V.; NOYER, J. L.; SINGH, N. K.; BALASUNDARAM, N.; BANSAL, K. C.; MOHAPATRA, T. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity in the sugarcane complex, *Saccharum* and *Erianthus*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Berlin, v. 53, n. 4, p. 831-842, 2006.

SMITH, L.B.; WASSHAUSEN, D.C.; KLEIN, R.M. Gramíneas. Gêneros: 85. *Paspalum* até 115. *Zea*. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues, 1982. p. 909-1410.

TATEOKA, T.; INOUE, S.; KAWANO, S. Notes on some grasses. IX. Systematic significance of bicellular microhairs of leaf epidermis. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 121, n.2, p. 80-91. 1959.

TILLICH, H. J. Ancestral and derived character states in seedlings of monocotyledons. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (Org.). **Monocots: Systematics and evolution**. Melbourne, AU: CSIRO, 2000. p. 221-228.

_____. Seedling diversity and homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). **Annals of Botany**, Oxford, UK, v. 100, p. 1-17, 2007.

TORRES, E. Historia de Gorgona. In: PRAHL, H.; ALBERICO, M. **Isla de Gorgona**. Bogotá, CO: Biblioteca Textos Universitários, 1986. p. 8-18.

TOTTMAN, D.R.; BROAD, H. The decimal code for the growth stages of cereals, with illustrations. **Annals of Applied Biology**, New Jersey, US, v. 110, p. 441-454, 1987.

VAN DILLEWIJN, C. **Botany of sugarcane**. Waltham: Chronica Botanica, 1952. 371p.

VENKATRAMAN, R. S. T. S. Germination and preservation of sugarcane pollen. **Agricultural Journal of India**, New Delhi, IN, v. 17, p. 127-132, 1922.

WATSON, L.; BELL, E.M. A surface-structural survey of some taxonomically diverse grass pollens. **Australian Journal of Botany**, Camberra, AU, v. 23, p. 981-990, 1975.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **Grass genera of the world**. Wallingford, UK: C.A.B. International, 1992. 1038p.

WEBSTER, R. D.; SHAW, R. B. Taxonomy of the native North American species of *Saccharum* (Poaceae: Andropogoneae). **SIDA, Contributions to Botany**, St. Louis, MO, p. 551-580, 1995.

WELKER, C. A. D.; LONGHI-WAGNER, H. M. The genera *Eriochrysis* P. Beauv., *Imperata* Cirillo and *Saccharum* L. (Poaceae - Andropogoneae - Saccharinae) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, SP, v. 35, n. 1, p. 87-105, 2012.

ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O.; VEGA, A. S.; GIUSSANI, L. M. Revisión y análisis cladístico de *Steinchisma* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, MO, v. 85, p. 631-656, 1998.

5 FENOLOGIA E COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE *Saccharum villosum* Steud.

Resumo

Os estudos fenológicos de uma espécie vegetal estão relacionados ao seu ciclo de vida e seus estádios de desenvolvimento, em conexão com a forma com que responde ao *habitat* em que vive. Sendo assim, os fatores ambientais influenciam fortemente o crescimento e florescimento da espécie. O comportamento reprodutivo de *Saccharum* sp. tem como característica ser alógamo em espécies cultivadas, porém, pouco se sabe sobre as características reprodutivas e fenológicas de *S. villosum*, um parente selvagem de cana-de-açúcar (*S. x officinarum*). Há grande interesse em se compreender o comportamento reprodutivo da espécie, pois estão sendo requeridas pesquisas acerca de fluxo gênico entre os parentais selvagens e as espécies cultivadas do gênero *Saccharum* sp. Nesse trabalho houve monitoramento do florescimento da espécie *S. villosum* no campo na população “Conchal” (Araras-SP) e em casa de vegetação com uma amostra de duas populações, “Índio Tibiriça” e “Bandeirantes” (Piracicaba-SP) ao longo de um ano (2014/2015). Além disso, coletaram-se espiguetas antes da abertura das inflorescências em três populações (Conchal, São Simão e Vargem Grande) para determinar se ocorre autogamia na espécie. A espécie apresentou florescimento durante todo o ano, com exceção do período de maior seca e temperaturas mais baixas. Nesse período foi observada a presença de sementes malformadas ao longo de três meses (Setembro a Dezembro) possivelmente decorrente da seca. A espécie apresentou sistema reprodutivo sazonal, que, de abril a julho foi alógamo e, de setembro a fevereiro, autógamo. Através desses resultados será possível subsidiar trabalhos futuros de cruzamentos e fluxo gênico entre *S. x officinarum* e *S. villosum*.

Palavras-chave: Comportamento reprodutivo; *Saccharum villosum*; Estudos fenológicos

Abstract

The phonological studies of a plant species are related to their life cycle and their developmental stages, in connection with the way it responds to the habitat in which it lives. Thus, environmental factors strongly influence the growth and the flowering of the species. The reproductive behavior of *Saccharum* sp. Is characterized as allogamous in cultivated species; however, little is known about the reproductive and phonological characteristics of *S. villosum*, a wild relative of sugar cane (*S. x officinarum*). There is great interest in understanding the reproductive behavior of the species, because research is being required on gene flow between wild and cultivated parental species of the genus *Saccharum* sp. In this work we monitored the flowering of the species *S. villosum* in the field in the population “Conchal” (Araras-SP) and in a greenhouse in Piracicaba-SP (samples from populations “Índio Tibiriça” and “Bandeirantes”) over one year (2014/2015). In addition, spikelets were collected before the opening of the flowers in three populations (“Conchal”, “São Simão” and “Vargem Grande”) to determine whether the species shows autogamy or allogamy. The species flowered throughout the year, except during intense drought and lower temperature periods. The presence of malformed seeds was observed over three months (September to December) possibly resulting from drought. The species showed seasonal reproductive behavior, which was allogamous from April to July and autogamous from September to February. These results will be used in future studies on crossing ability and gene flow between *S. x officinarum* and *S. villosum*.

Keywords: Reproductive behavior; *Saccharum villosum*; Phonological studies

5.1 Introdução

Os estudos de fenologia de uma planta estão relacionados com seu ciclo de vida, sua história e seus estádios de desenvolvimento (embriogênese, desenvolvimento vegetativo e reprodutivo) (MORELLATO, 1995). Durante seu desenvolvimento, a planta é influenciada pelo ambiente em que se encontra e, assim, responde de acordo com as pressões evolutivas que determinada espécie sofreu ao longo do seu surgimento. A descrição do desenvolvimento da planta do embrião até a fase adulta permite um conhecimento mais completo do fenótipo, que não se resume à vida adulta, e também das características de possível interesse agrônômico. O comportamento fenológico reprodutivo é altamente influenciado por fatores climáticos como temperatura, latitude, nutrientes do solo, fotoperíodo e umidade, além de fatores genéticos e hormonais (BONNETT, 2014; LARGE, 1954; NEWMAN & BEARD, 1962; TOTTMAN & BROAD, 1987).

O comportamento reprodutivo de uma espécie vegetal pode ser determinado a partir de três possibilidades: a planta pode ser predominantemente autopolinizada (autógama), pode apresentar polinização cruzada (alógama) ou ainda ser uma planta mista com determinadas porcentagens de autopolinização e de polinização cruzada. Um sistema reprodutivo plástico, i.e., variável com o ambiente, permite que a planta se adapte a essas mudanças ambientais e que colonize novas áreas, que frequentemente apresentam condições ambientais adversas, permitindo assim, a expansão territorial (ALLARD, 1971; MENDES, 2013). Portanto, o sistema reprodutivo pode influenciar a capacidade de adaptação a novos *habitat*.

A biologia reprodutiva do gênero *Saccharum* sp., de forma geral, pode englobar processos assexuados e sexuados. Em cana-de-açúcar (*S. x officinarum*), a reprodução pode acontecer de ambas as formas; geralmente, as culturas comerciais são propagadas de forma assexuada, com a produção de clones, os quais foram antecipadamente obtidos por melhoramento genético, com o objetivo de satisfazer as necessidades comerciais (RAE et al., 2014). O sistema reprodutivo encontrado em espécies de *Saccharum* sp. é a alogamia; porém, ainda não se conhece a biologia reprodutiva das espécies selvagens endêmicas da América do Sul (*S. asperum*, *S. angustifolium* e *S. villosum*).

Neste trabalho, será dado destaque para os aspectos fenológicos de *S. villosum*, visto que se trata de uma espécie que apresenta larga ocorrência na região Centro-Sul do Brasil (FILGUEIRAS & LERINA, 2001). Nessa região, as cultivares de cana-de-açúcar são cultivadas em ampla extensão do território. Devido à grande importância comercial da cultura no país e ao crescente interesse na liberação de OGMs de cana-de-açúcar, as pesquisas relacionadas ao

fluxo gênico e à biologia reprodutiva entre espécies de *Saccharum* selvagens e híbridos comerciais tornaram-se essenciais para a avaliação de risco ao meio ambiente (CARRER et al., 2010; GIULIANI, 2000).

Em cana-de-açúcar, o sistema reprodutivo é alógamo e o período de florescimento varia de abril a junho na região Centro-Sul do Brasil (HUMBERT, 1974). A variação no florescimento da cana-de-açúcar comercial é influenciada pela latitude, fotoperíodo, temperatura e umidade, que variam ao longo da região; em algumas áreas, alguns híbridos de cana-de-açúcar não florescem, ou o fazem muito raramente (DE ALMEIDA et al., 1945; GOSNELL, 1973; BERDING, 1981; PEREIRA, 1985). Em condições comerciais, o florescimento é indesejável pois drena recursos da planta que deveriam ser armazenados no caule na forma de sacarose.

De acordo com estudos prévios, a espécie *S. villosum* Steud. pode ocorrer em locais de intenso cultivo e apresentar riscos de fluxo de genes com a cultura de cana-de-açúcar, resultando em introgressão gênica (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). A possibilidade de fluxo gênico está intrinsecamente relacionada à sincronização do florescimento entre as plantas com mesma localização geográfica e ao sistema reprodutivo encontrado nas espécies envolvidas, assim como a outros fatores (GEPTS & PAPA, 2003).

Como mencionado anteriormente, a cana-de-açúcar apresenta comportamento reprodutivo alógamo. Portanto, é possível que cultivares OGMs ocasionalmente contaminem, através de fluxo gênico, parentes selvagens que eventualmente estejam receptivos no requisito temporal de florescimento, razão pela qual são fundamentais as análises de comportamento reprodutivo da espécie *Saccharum villosum* Steud.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Monitoramento do florescimento em campo

O monitoramento da incidência de florescimento de *Saccharum villosum* no campo foi acompanhado mensalmente em uma população na região rural do município de Araras-SP (22°23'23.48" S e 47°19'13.30"), ao longo de 13 meses, entre fevereiro de 2014 a fevereiro de 2015. A população foi denominada "Conchal" e nela foram observados 10 indivíduos tomados ao acaso. Foram obtidas as quantidades de inflorescências emergentes em cada mês.

5.2.2 Monitoramento do comportamento *ex situ*

Para o monitoramento do comportamento reprodutivo da espécie *Saccharum villosum* Steud., foram utilizados indivíduos provenientes de duas populações. Uma das populações é localizada na rodovia Índio Tibiriça (SP-31) (23° 68' 55.48'' S e 46° 37' 26.62'') e a outra localizada na rodovia Bandeirantes (SP-348), km-34 (23° 35' 09.11'' S e 46° 80' 10.47'' O). Todas as coletas foram auxiliadas pela pesquisadora Regina Shirasuna, do Instituto de Botânica de São Paulo.

Na população “Índio Tibiriça”, foram coletados quatro indivíduos de *Saccharum villosum* que posteriormente foram transplantados para vasos plásticos de 40 cm de diâmetro e 50 cm de altura com substrato Basaplant[®], na casa de vegetação do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) e assim, mantidos com temperatura e umidade ambiente, sofrendo influência do ambiente externo, porém com irrigação controlada.

Na população “Bandeirantes”, obtiveram-se as sementes para realização de germinação em *in vitro* e posteriormente aclimatizadas em casa de vegetação. Para a germinação, as sementes foram levadas para uma câmara de germinação B.O.D. em placas de Petri e papel filtro como substrato, a temperatura e fotoperíodo controlados. Após a emissão da primeira folha, as plântulas foram aclimatizadas em casa de vegetação nas condições ditas anteriormente, plantadas em substrato vermiculita e Basaplant[®] em sementeiras de isopor até o desenvolvimento da raiz. Posteriormente, os indivíduos foram plantados em vasos plásticos de 40 cm de diâmetro e 50 cm de altura com substrato Basaplant[®] e mantidas em temperatura e umidade ambiente até seu período reprodutivo. Pelo método de germinação *in vitro*, obtiveram-se seis indivíduos da espécie *S. villosum*, totalizando dez indivíduos que foram submetidos a monitoramento.

Os indivíduos foram monitorados semanalmente de abril/14 até abril/15 e foram feitas as seguintes observações: presença ou ausência de inflorescências e presença ou ausência da exposição dos órgãos reprodutivos (estigmas e anteras) para polinização cruzada (indicadores parciais de autogamia ou alogamia).

5.2.2.1 Análises de sementes malformadas

No mês de Dezembro/14 foram coletadas amostras de sementes, que se encontraram malformadas, provenientes de 10 indivíduos diferentes. As sementes foram fotografadas e foram obtidas as medidas do seu tamanho com o auxílio do microscópio estereoscópico Leica

EZ4D no Laboratório de Histopatologia e Biologia estrutural de plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, sendo as imagens digitalizadas.

5.2.3 Análises de formação de embrião

Para a realização das análises que procuraram evidências de autogamia em *S. villosum*, foram coletadas amostras de inflorescências ao longo do ano. As amostras provieram de três populações: “São Simão” localizada no município de São Simão-SP (21° 29' 48.18'' S 47° 36' 30.65'' O), “Vargem Grande”, localizada no município de Vargem Grande do Sul-SP (21° 49' 28.99'' S e 46° 57' 21.09'' O), e Conchal (22°23'23.48'' S e 47°19'13.30''O), retiradas da planta ainda dentro da folha-bandeira.

As amostras foram fixadas em FAA (formol a 40%, 5 mL; álcool a 70%, 90 mL e ácido acético glacial, 5 mL) e posteriormente observadas com o auxílio do microscópio estereoscópico Leica EZ4D no Laboratório de Histopatologia e Biologia estrutural de plantas, sendo as imagens digitalizadas. Para a detecção da autogamia, foi analisada a presença ou ausência de sementes no estágio de desenvolvimento em que as inflorescências ainda não abriram e se encontram dentro da folha-bandeira.

5.3 Resultados e Discussão

O florescimento na região centro-sul (população do município de Araras-SP) da espécie *S. villosum* variou significativamente ao longo de um ano. Em fevereiro/15 houve um aumento de 33,3% em comparação com o mesmo período do ano anterior. O florescimento caiu cerca de 95% de fevereiro a julho. Contudo, houve decréscimo no período entre junho e agosto/2014, voltando a florescer apenas em novembro/dezembro, após um período de ausência de florescimento (Figura 5.1).

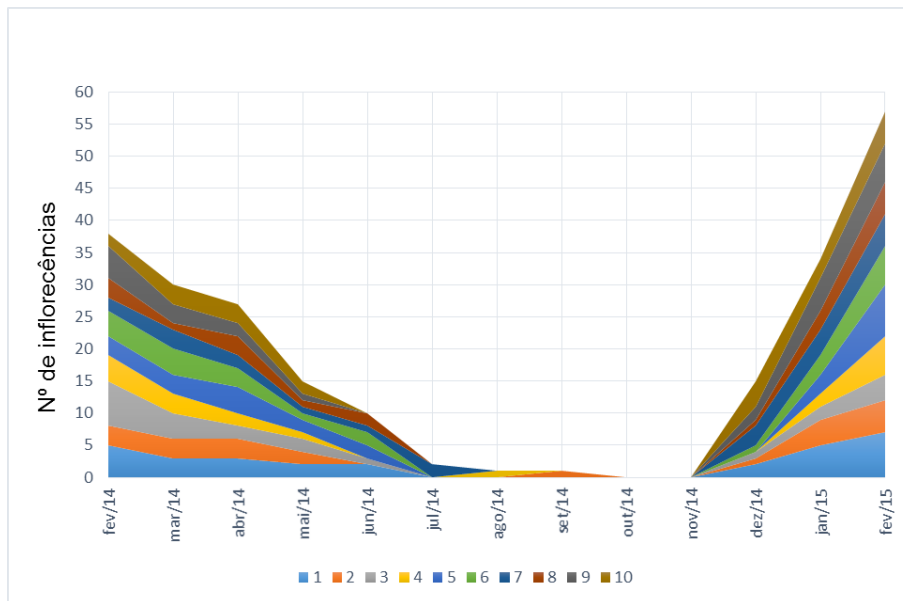


Figura 5.1 – Gráfico de área empilhada esquematizando a frequência de florescimento da espécie *Saccharum villosum* Steud. ao longo de um ano no período de (fev/14 a fev/15), de dez indivíduos monitorados em campo (Município de Araras-SP)

O florescimento é afetado principalmente por fatores ambientais, como temperatura, fotoperíodo, umidade do ar e do solo (SRIVASTAVA et al., 2006). O florescimento em *Saccharum* sp. é fortemente influenciado pelo fotoperíodo pois são plantas que sofrem indução ao florescimento por sucessivos dias curtos (TAIZ & ZAIGER, 2009). Os resultados da queda de florescimento observados em *S. villosum* condizem com o período em que a incidência de radiação solar decresce na região centro-sul do Brasil. A variação da incidência de radiação solar é maior do que na região próxima do Equador, região do centro de origem de *Saccharum* e *Erianthus*, gênero ao qual anteriormente pertencia a espécie *S. villosum* (MUKHERJEE, 1957; PEREIRA et al., 2006).

Entretanto, o florescimento em *Saccharum* sp. não é determinado apenas pelo fotoperíodo nessa região, mas também sofre importante variação por influência da temperatura. Temperaturas noturnas menores do que 18° C no período de indução floral prejudicam e retardam a emissão das espiguetas (GOSNELL, 1973).

O ciclo reprodutivo da *S. villosum* Steud varia de acordo com a época do ano. A dispersão dos grãos de pólen ocorre no final do mês de março até início de junho, portanto, no outono e no início do inverno, período em que a espécie teve comportamento alógamo em 2014/2015 (Figura 5.2 F).

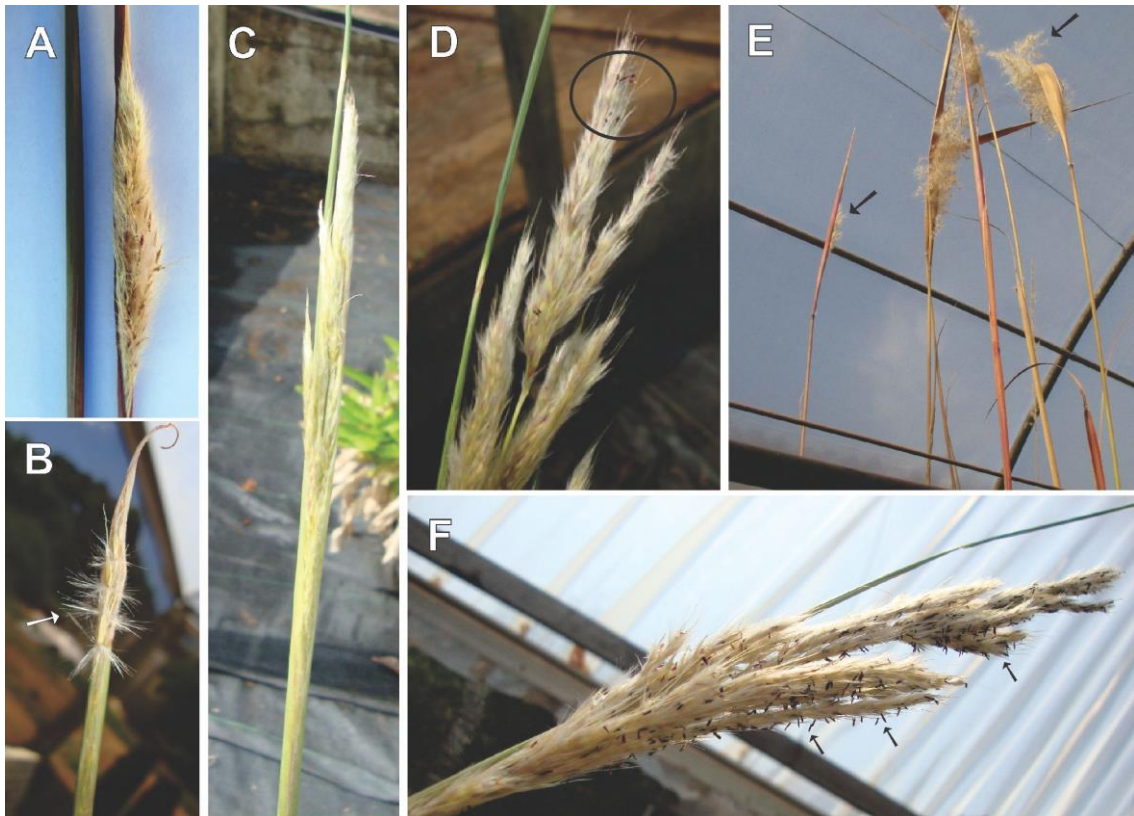


Figura 5.2 – Ciclo reprodutivo da espécie *Saccharum villosum* Steud. A) À esquerda representação da folha-bandeira, à direita espiguetas sendo liberadas com sementes após abertura da folha-bandeira. B) Inflorescência em abertura liberando as espiguetas contendo sementes (Seta). C) Inflorescência em pré-antese. D) Inflorescência iniciando a antese, do ápice (Círculo) para base da inflorescência. E) Inflorescências pós-antese liberando sementes (Setas). F) Inflorescência completa em antese. Detalhe das anteras (Setas)

Após o desenvolvimento das sementes, a dispersão ocorre normalmente através de anemocoria (Figura 5.2 E), característica de dispersão de sementes predominante em gramíneas (Poaceae).

Nos meses de junho a agosto não houve observação de inflorescências nas plantas monitoradas. Esse dado corrobora o que foi observado em campo (Figura 5.1) em que se observou queda de florescimento nesse período. Conforme a classificação de Köppen, Piracicaba tem clima do tipo Cwa, que significa que o clima é tropical e de altitude com os meses de junho, julho e agosto mais secos e frios (BORBA et al., 2005). Deste modo, o clima colabora com a queda na frequência de inflorescências nesse período já que a espécie tem afinidade com regiões de campos úmidos e temperaturas noturnas altas (acima de 18°C) para indução floral (GOSNELL, 1973; WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012).

Em setembro, gradativamente aumenta o número de inflorescências. As espiguetas se abrem já contendo sementes. Porém, observou-se que, em média, $91,583\% \pm 0,679$ das espiguetas contêm sementes malformadas, apenas com algum tecido residual ou sem a presença

de embrião (MAPA, 2009). Foram encontradas de 88 a 95% de espiguetas com sementes malformadas por inflorescência (Figura 5.3 A).

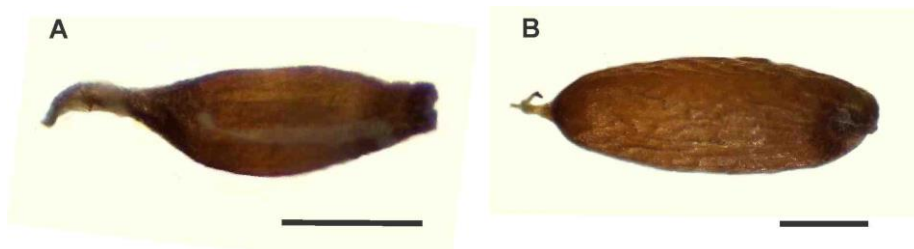


Figura 5.3 – A) Representação de semente malformada de *Saccharum villosum* Steud. em período de seca na região Centro-sul do Brasil. B) Representação de semente normal em período de seca na região Centro-sul do Brasil. Barras: 0,25 mm

Esse comportamento pode estar relacionado à falta de chuva no estado de São Paulo. A seca no estado foi registrada como a pior dos últimos 20 anos no início do período chuvoso segundo dados do IAG (2014). Tal situação é semelhante à que ocorre com a espécie *Caesalpinia pyramidalis* Tul. na região semiárida do Brasil, a irregularidade e a má distribuição de chuvas comprometendo a formação das sementes da espécie (DE OLIVEIRA et al., 2011).

As sementes malformadas são estruturalmente menores ($0,9041\text{mm} \pm 0,3361$) do que as sementes normais ($2,1315\text{mm} \pm 0,2532$). Esse fenômeno também poderia ser explicado pela ocorrência de apomixia, ou seja, poderia ter ocorrido a formação de sementes sem que houvesse fecundação (agamospermia), desenvolvendo-se o embrião a partir de células somáticas ou da oosfera não reduzida, e dando origem a filhos geneticamente idênticos ou muito parecidos com a planta mãe (ASKER & JERLING, 1992). De acordo com Dall'agnol & Schifino-Wittmann (2005), sessenta e cinco por cento das espécies apomíticas ocorrem nas famílias Poaceae, Asteraceae e Rosaceae. No entanto, nenhuma evidência conclusiva foi encontrada em favor dessa hipótese até agora.

A má formação das sementes também pode ser explicada pela falha no desenvolvimento em três possíveis estádios: no estágio trapezoidal, ou seja, no momento da formação do cotilédone da semente, no estágio entalhado, que marca o começo da diferenciação radicular, caulinar e do procâmbio, ou no estágio torpedo, momento da diferenciação do hipocótilo, da radícula e do tecido vascular (FERREIRA & BORGUETTI, 2004). A planta pode ter cessado o desenvolvimento das sementes, o que resultou no aborto das sementes, ocasionado por conflitos entre a planta mãe e a progênie na atribuição de recursos (BAWA et al., 1989). Esse comportamento poderia ser resultado de estresse ambiental sofrido pela planta (WIENS et al., 1987) ou anormalidade na formação dos óvulos (PALSER et al., 1990; SEDGLEY &

GRANGER, 1996). O tipo de pólen que fertiliza o óvulo também pode interferir na formação do embrião e resultar na perda de sementes após a fecundação (CHACOFF et al., 2008).

As análises de formação de embrião revelaram que, nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro e março, as inflorescências emergiram, mas a antese ocorreu anteriormente à abertura das inflorescências e à emergência a partir da folha-bandeira, produzindo, assim, sementes viáveis para a dispersão (Figura 5.4; Figura 5.2 A).

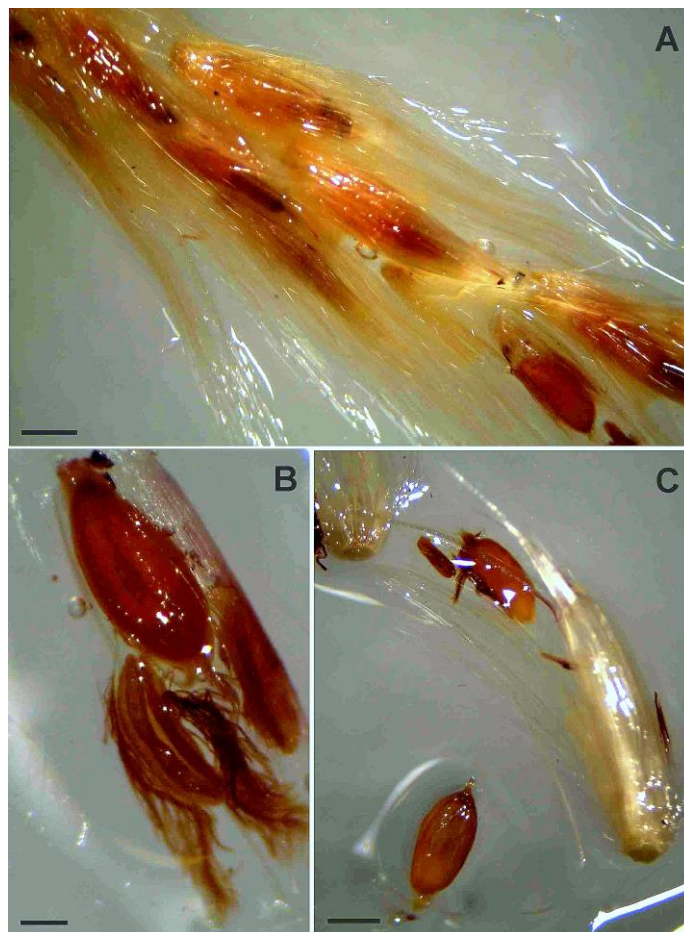


Figura 5.4 – Espiguetas e sementes provenientes de três populações da região centro-sul do Brasil coletadas dentro da folha bandeira. A) Amostra coletada na população “São Simão”. B) Amostra coletada da população “Conchal”. C) Amostra coletada na população “Vargem Grande”. Barras: A, C= 1mm; B = 0,25 mm

Essa observação indica que, pelo menos naquele ano, essa estação caracterizou-se pela presença de autogamia na população. A possibilidade de que a estação autogâmica e a estação alogâmica se distribuam de maneiras diferentes dependendo do ano deve ser verificada futuramente com observações em vários anos.

O florescimento da espécie pode estar relacionado ao clima e ao fotoperíodo, tanto para a presença quanto para a ausência de antese e dispersão de sementes na espécie. O gênero tem

origem em regiões de latitudes muito baixas, ou seja, próximas do equador, sendo possível supor que as espécies de *Saccharum* sp. possam ter evoluído com a necessidade de menores latitudes. Uma espécie asiática do gênero, *S. spontaneum*, quando se encontra em latitudes mais altas, tem necessidade de dias mais longos para o florescimento (PANJE & SRINIVASAN, 1959 apud MOORE & BOTHA, 2014). Portanto, a ausência de florescimento no período do ano com dias mais curtos, e baixas temperaturas noturnas nos meses de junho a agosto não contribui para a indução do florescimento de *S. villosum* Steud., prejudicando, assim, a reprodução nesses meses e nos imediatamente seguintes.

Levando em consideração a possibilidade de ocorrer fluxo gênico entre a cana-de-açúcar e seu parente selvagem (*S. villosum* Steud) na região Centro-sul do Brasil, é importante o dado de que o florescimento da cultivar ocorre entre abril e junho (HUMBERT, 1974). Em *S. villosum*, o florescimento foi entre o final do mês de março e meados de julho, período em que a planta apresentou comportamento alógamo. Portanto, a probabilidade de ocorrer fluxo gênico em ambos os sentidos seria considerável nesse período do ano. O oposto ocorre de agosto a março, em que não há inflorescências de *S. villosum* ou a planta apresenta comportamento autógamo, de qualquer forma não acarretando riscos de biossegurança relacionados a cruzamentos espontâneos com cultivares de cana, além de não haver florescimento da própria cultura.

5.4 Conclusão

Através deste trabalho é possível concluir que o florescimento de *S. villosum* ocorre durante todo o ano, porém com menor frequência em períodos de maior seca e temperaturas mais baixas. É possível concluir também que a espécie tem sistema reprodutivo sazonal, ao menos no ano observado, que apresenta alogamia de abril a julho e autogamia de setembro a fevereiro. Estes resultados subsidiarão trabalhos futuros de fluxo gênico entre cultivares de *S. x officinarum* e *S. villosum*. A presença de autogamia obrigatória evitaria qualquer risco de cruzamento espontâneo entre *S. x officinarum* e *S. villosum*, mas se a frequência de autogamia variar ao longo do ano, como este trabalho indica, e entre diferentes anos, haverá necessidades de maiores cuidados antes da liberação de OGMs.

Referências

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Rio de Janeiro, RJ: Edgard Blucher, 1971. 381p.

- ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Flórida: CRC Press, 1992. 320p.
- BAWA, K. S.; HEDGE, S. G.; GANESHIAH, K. N.; UMA SHAANKER, R. Embryo and seed abortion in plants. **Nature**, California, v. 342, n. 6250, p. 625, 1989.
- BERDING, N. Improved flowering and pollen fertility in sugarcane under increased night temperature. **Crop Science**, Madison, v. 21, p. 863-867, 1981.
- BONNETT, G. D. Developmental Stages (Phenology) In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Org.). **Sugarcane: Physiology, Biochemistry & Functional Biology**. New Jersey, US: John Wiley & Sons, 2014. p. 35-50.
- BORBA, M. R. C.; SCARPARE FILHO, J. A.; KLUGE, R. A. Teores de carboidratos em pessegueiros submetidos a diferentes intensidades de poda verde em clima tropical. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 68-72, 2005.
- CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos Avançados**, São Paulo, SP, v. 24, n. 70, p. 149-164, 2010.
- CHACOFF, N. P.; GARCIA, D.; OBESO, J. R. Effects of pollen quality and quantity on pollen limitation in *Crataegus monogyna* (Rosaceae) in NW Spain. Amsterdam, NE, **Flora**, v. 203, n. 6, p. 499-507, 2008.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H.M.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; FILGUEIRAS, T.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E. DA SILVA, W.J.; SILVA FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, Berlin, v. 4, n. 1, p. 62–89, 2011.
- DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, SP, v. 11, n. 2. 2005.
- DE ALMEIDA, J. R.; VALSECCHI, O; GOMES, F. P. O florescimento da cana-de-açúcar. **Análise**, Piracicaba, v. 285, p. 87, 1945.
- DE OLIVEIRA, L. M.; BRUNO, R. L. A.; SILVA, K. R. G.; ALVES, E. U.; SILVA, G. Z.; ANDRADE, A. P. Qualidade fisiológica de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, PR, v. 33, n. 2, p. 289-298, 2011.
- FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2004. 324p.
- FILGUEIRAS, T. S.; LERINA, R. *Saccharum* L. In: WANDERLEY, M. D. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo, SP: FAPESP, 2001. p. 108-110.
- GEPTS, P; PAPA, R. Possible effects of (trans) gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. **Environmental biosafety research**, Cambridge, UK, v. 2, n. 02, p. 89-103, 2003.

GIULIANI, G.M. O dilema dos transgênicos. **Estudos Sociedade e Agricultura**, Rio de Janeiro, RJ, n. 15, 2000.

GOSNELL, J. M. Some factors affecting flowering in sugarcane. **Proceeding of the South African Sugarcane Technologist Assosiation**, Mauritius, CF, v.4 7, p. 144–147, 1973.

HUMBERT, R.P. **El cultivo de la caña de azúcar**. Cidade do México: Compañía Editorial Continental, 1974. 719p.

IAG. **Estação Meteorológica do IAG-USP** - Resumo Mensal. 28. ed. São Paulo, SP, 2014.

LARGE, E. C. Growth stages in cereals illustration of the Feekes scale. **Plant Pathology**, New Jersey, US, v. 3, p. 128–129, 1954.

MAPA. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Assessoria de comunicação social, 2009. 398p.

MENDES, A. D. R.; MARTINS, E. R.; FIGUEIREDO, L. S. Estudo do sistema de reprodução da fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 4, p. 607-608, 2013.

MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. **Sugarcane: Physiology, Biochemistry & Functional Biology**. New Jersey, US: John Wiley & Sons Inc., 2014. 693p.

MORELLATO, L. P. C. As estações do ano na floresta. In: LEITÃO FILHO, H.F. E MORELLATO, L. P. C. (Orgs.). **Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra**. Campinas, SP: UNICAMP, 1995. p. 187-192.

MUKHERJEE, S. K. Origin and Distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette**, Chicago, US, v. 119, n. 1, p. 55-61, 1957.

NEWMAN, J. E.; BEARD, J. B. Phenological observations: the dependent variable in bioclimatic and agrometeorological studies. **Agronomy Journal**, Flórida, US, v. 54, p. 399–403, 1962.

PALSER, B. F.; ROUSE, J. L.; WILLIAMS, E. G. Aberrant ovules and megagametophytes in *Rhododendron nuttallii* (Ericaceae). **Botanical Gazette**, Chicago, US, v.151, n. 1, p. 73-87, 1990.

PANJE, R. R.; SRINIVASAN, K. Studies in *Saccharum spontaneum*. The flowering behavior of latitudinally displaced populations. **Botanical Gazette**, Chicago, US, v. 120, p. 193–202, 1959.

PEREIRA, A. R. Previsão do florescimento em cana-de-açúcar. **Comunicação da Pesquisa Agropecuária**, São Paulo, SP, v. 3, n. 6, p. 15-16, 1985.

PEREIRA, E. B.; MARTINS, F. R.; DE ABREU, S. L.; RÜTHER, R. **Atlas brasileiro de energia solar**. São José dos Campos: INPE, 2006. 64p.

RAE, A. L.; MARTINELLI, A. P.; DORNELA, M. C. Anatomy and Morphology. In: MOORE, P.H.; BOTHA, F.C. (Orgs.). **Sugarcane: Physiology, Biochemistry & Functional Biology**. New Jersey, US: John Wiley & Sons, 2014. p. 19-33.

- SEDGLEY, M.; GRANGER, L. Embryology of *Eucalyptus spathulata* and *E. platypus* (Myrtaceae) following selfing, crossing and reciprocal interspecific pollination. **Australian Journal of Botany**, Canberra, AU, v. 44, p. 661-671, 1996.
- SRIVASTAVA, R. P.; SINGH, S.E.; SINGH, P.; SINGH, S. B. Artificial Induction of Flowering in Sugarcane Under Sub-tropical Conditions - A Successful Approach. **Sugarcane Research Institute**, Shahjahanpur, v.8, n. 2, p. 184-186, 2006.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2009. 820p.
- TOTTMAN, D. R.; BROAD, H. The decimal code for the growth stages of cereals, with illustrations. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 110, p. 441-454, 1987.
- WELKER, C. A. D.; LONGHI-WAGNER, H. M. The genera *Eriochrysis* P. Beauv., *Imperata Cirillo* and *Saccharum* L. (Poaceae - Andropogoneae - Saccharinae) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal Bototany**, Porto Alegre, RS, v. 35, n. 1, p. 87-105, 2012.
- WIENS, D.; CALVIN, C. L.; WILSON, C. A.; DAVERN, C. I.; FRANK, D.; SEAVEY, S. R. Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. **Oecologia**, Berlin, v. 71, p. 501-509, 1987.

6 SEXAGEM DE HÍBRIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR E VIABILIDADE POLÍNICA DE *Saccharum* sp. PROVENIENTES DA REGIÃO CENTRO-SUL DO BRASIL

Resumo

A presença de espiguetas hermafroditas é comum nas espécies pertencentes ao gênero *Saccharum* sp. Porém, em cana-de-açúcar, é possível encontrar diversas variações na reprodução como: espiguetas totalmente femininas ou totalmente masculinas, anteras sem pólen ou com pólen inviável em suas inflorescências. O florescimento e a viabilidade de pólen da cana-de-açúcar são significativamente influenciados pelas condições climáticas e as da região Centro-Sul do Brasil dificultam a reprodução. A sexagem e a investigação acerca da viabilidade dos grãos de pólen nessa região são indispensáveis para trabalhos com fluxo gênico entre parentais selvagens do gênero *Saccharum* sp. Para isso, foram coletados híbridos de cana-de-açúcar atualmente comercializados na região Centro-Sul do Brasil, para análise de sua reprodução e da viabilidade de seu pólen. Foram encontradas espiguetas típicas de cana-de-açúcar, espiguetas variando de hermafroditas a femininas, anteras sem pólen, ovários duplos e produção de sementes entre os híbridos analisados. Em relação à viabilidade polínica das espécies, foi encontrada pelo menos alguma viabilidade em todos os híbridos de cana-de-açúcar da região analisados neste estudo, tendo sido atingido o valor máximo de 62% de pólen viável. Também foi quantificada a viabilidade polínica de *S. villosum*, o qual alcançou o valor de 93%. A partir dessas análises, é possível concluir que os caracteres florais de cana-de-açúcar na região Centro-Sul do Brasil são semelhantes aos já relatados anteriormente na literatura e que a reprodução é estritamente viável, com a produção espontânea de sementes e de grãos de pólen viáveis, mesmo em condições climáticas consideradas adversas. Esses dados mostram que algumas das condições para o fluxo gênico entre híbridos de cana-de-açúcar provenientes da região Centro-Sul do Brasil e *S. villosum* são atendidas, restando testar a efetividade dos cruzamentos interespecíficos em condições controladas e no campo.

Palavras-chave: Sexagem; Florescimento; Viabilidade polínica

Abstract

Hermaphroditic spikelets are common in species of the genus *Saccharum*. In sugarcane, several additional variations on the floral characters can be found, such as fully female spikelets, anthers without pollen, unviable pollen or even exclusively male spikelets. The flowering and viability of sugarcane pollen is significantly influenced by weather conditions. In the Center-South region of Brazil, for instance, the adverse weather conditions hinder reproduction. Research on the sexing of sugarcane hybrids and on the viability of pollen grains in this region is indispensable for studies on gene flow between sugarcane and its wild relatives of the genus *Saccharum*. With this objective in mind, hybrids of sugar cane currently cultivated in the Center-South region of Brazil were collected for the analysis of some aspects of their reproduction, including pollen viability. Typical hermaphroditic spikelets of sugar cane were found, but also female spikelets. Anthers without pollen, double ovaries and the production of seeds were identified in the hybrids analyzed. Regarding the pollen viability of the species, at least some viability was found in every sugarcane hybrid in the region, with a maximum of 62% of viable pollen. We also quantified the pollen viability of a wild relative of sugarcane, *S. villosum*, which reached 93%. Based on these analyses, we conclude that the floral characters

of sugarcane in the Center-South region of Brazil are similar to those previously reported in the literature and reproduction is strictly viable, with the spontaneous production of seeds and of viable pollen grains in weather conditions considered adverse. These data show that some of the conditions for gene flow between sugarcane hybrids from Center-South Brazil and *S. villosum* exist. The effectiveness of the interspecific crosses both under controlled and field conditions remains to be tested.

Keywords: Sexing; Flowering; Pollen viability

6.1 Introdução

As populações domesticadas e as silvestres aparentadas são muitas vezes simpátricas, especialmente quando as domesticadas continuam a ser plantadas na região em que elas evoluíram a partir de uma ou mais daquelas selvagens, como é o caso da cana-de-açúcar plantada na Australásia. Em vários casos, a área de plantio da espécie domesticada é expandida (muitas vezes intercontinentalmente) para regiões em que, embora os ancestrais selvagens estejam ausentes, ocorrem outros parentes selvagens, caso em que se inclui a cana-de-açúcar plantada na América do Sul. Devido a sua proximidade filogenética, esses parentes selvagens não-ancestrais também têm a possibilidade de pertencer ao Complexo Gênico Primário e cruzar com as populações cultivadas. A espécie domesticada está muitas vezes plantada a uma distância das populações naturais que permite a polinização cruzada com estas (Figura 6.1), com a subsequente formação de híbridos e a introgressão de genes das domesticadas nas selvagens (HARLAN, 1975).



Figura 6.1 – Demonstração da distribuição de uma população de *Saccharum* selvagem ao lado de plantações de cana-de-açúcar. Foto: BRESSAN, E. A.

As consequências da introgressão variam desde a total assimilação genética, em que os alelos da silvestre são quase que totalmente substituídos pelos da domesticada, dando origem a uma raça invasora coexistente com a domesticada, até a incorporação dos alelos da domesticada ao conjunto gênico da silvestre, aumentando sua diversidade sem descaracterizá-lo. A primeira alternativa é indesejável tanto do ponto de vista agrícola quanto do conservacionista, pois implica na perda da variação genética natural, necessária tanto como germoplasma para o melhoramento da raça domesticada quanto para a evolução da silvestre. O impacto genético das plantas cultivadas sobre as selvagens geralmente é grande, se a seleção contrária é pequena, e disso decorre a preocupação com a liberação de cultivares transgênicos (HAYGOOD et al., 2003).

Os parentes selvagens de *Saccharum* sp. (*S. villosum*, *S. asperum*) ocorrentes na região Centro-Sul, com destaque para *S. villosum* Steud., foram pouco explorados cientificamente, especialmente em relação à reprodução. A possibilidade de ocorrência de fluxo gênico entre estas espécies nativas e híbridos comerciais de cana-de-açúcar nunca foi publicada (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Neste capítulo serão tratados dois dentre os muitos componentes dos sistemas reprodutivos de cana-de-açúcar e dessas espécies silvestres de *Saccharum* cujo conhecimento é fundamental para se determinar a possibilidade de fluxo gênico interespecífico. O primeiro é a distribuição de sexos em cana-de-açúcar e o segundo, a viabilidade polínica de *S. villosum*.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Materiais

Os híbridos utilizados foram coletados no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, Araras-SP (RB855156; RB855453; RB966928, SP813250) e no Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba-SP (CTEP07148; CTP 07124, RB937570).

6.2.2 Métodos

6.2.2.1 Sexagem de híbridos de cana-de-açúcar

Foram analisados e comparados qualitativa e morfológicamente botões florais em dois estádios de desenvolvimento: (1) espiguetas e inflorescências fechadas e (2) espiguetas e inflorescências abertas. As amostras foram fixadas em etanol 70% a vácuo para visualização de

suas estruturas reprodutivas em microscópio estereoscópico Leica EZ4D no Laboratório de Histopatologia e Biologia, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), sendo as imagens digitalizadas. As espiguetas foram observadas e descritas, a fim de definir a presença ou ausência de gineceu e/ou de androceu nas espiguetas dos híbridos de cana-de-açúcar.

Para as análises anatômicas das espiguetas de cana-de-açúcar, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (40-100%). Posteriormente as amostras foram transferidas para propanol 100% por 8 horas seguida de butanol 100% *overnight*. A infiltração foi feita lentamente usando butanol: meio de infiltração (Leica, Heidelberg, Germany) (3:1, 1:1, 1:2), a 4°C e colocadas em meio de infiltração por 10 dias. A polimerização foi realizada em meio de infiltração e endurecedor, conforme recomendação do fabricante, à temperatura ambiente por 48 horas. As secções histológicas (5µm) foram obtidas em micrótomo rotativo RM2155 Leica e contrastadas com solução de fucsina ácida 1% em água e azul de toluidina 0,05% (FEDER & O'BRIEN, 1968). As secções contrastadas foram montadas utilizando lamínula e entelan®. As amostras foram observadas ao microscópio ótico Leica LMD CTR 7000 sendo as imagens digitalizadas.

6.2.2.2 Viabilidade polínica de *Saccharum* sp.

A viabilidade dos pólenes de canas-de-açúcar na região Centro-Sul do Brasil foram obtidas a partir dos híbridos: SP89-1115; SP813250; RB855156; RB855453; RB966928 e RB937570 e do parental selvagem da cana-de-açúcar *Saccharum villosum*. As anteras foram retiradas das espiguetas, armazenadas em tubos eppendorf e mantidas em nitrogênio líquido para evitar danos aos grãos de pólen.

Para a realização das análises, os grãos de pólen foram colocados em eppendorf juntamente com solução de Alexander (500 µg de corante de Alexander e 20 µg de ácido acético) (ALEXANDER, 1980). As anteras foram pressionadas para liberar os grãos de pólen delicadamente, e deixadas em repouso por 2 horas. Posteriormente, o conteúdo sedimentado foi retirado com uma pipeta, colocado em uma lâmina de vidro, e pressionado contra uma lamínula para ser analisado em microscópio óptico (Leica LMD 7000).

As amostras foram analisadas em seguida, sendo montadas duas lâminas (repetições) por espécie. Em cada lâmina, foram tomados ao acaso cinco quadrantes contendo dez grãos de pólen e realizadas as contagens de grãos de pólen viáveis por quadrante. Portanto, foram analisados 100 grãos de pólen por espécie de *Saccharum* sp. (AMARAL et al, 2012). As análises estatísticas descritivas foram realizadas a partir do software OriginPro 8.

6.3 Resultados e Discussão

Dentre os híbridos de cana-de-açúcar analisados foram encontradas espiguetas hermafroditas e femininas (híbridos ginomonóicos) e híbridos exclusivamente hermafroditas.

O híbrido CTP 07124 (Figura 6.2) é um exemplo de cultivar hermafrodita (Figura 6.2 D) mas com algumas espiguetas exclusivamente femininas (ginomonóico; Figura 6.3).



Figura 6.2 – Espiguetas de cana-de-açúcar do híbrido CTP 07124. A) Espiguetas (ep) de cana-de-açúcar fechada. B-C) Botão floral aberto, mostrando em evidência os estigmas (et) das espiguetas femininas. D) Espiguetas hermafroditas abertas em antese com presença dos estigmas e anteras (an). Barras: A-D= 0,5mm

No quadro B da figura 6.3 é possível notar a presença somente do gineceu na espiguetas em formação do híbrido CTP 07124.

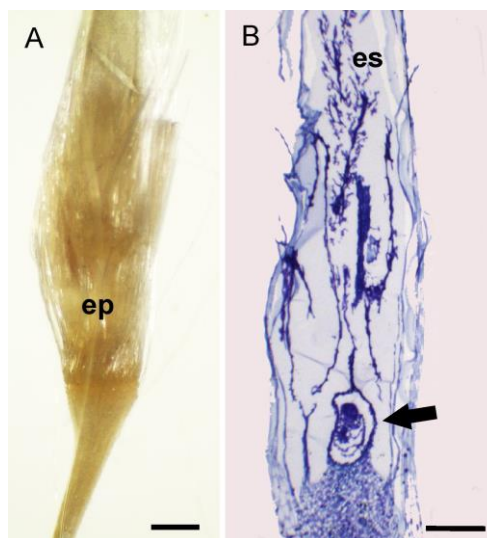


Figura 6.3 - *Saccharum x officinarum*, híbrido CTP 07124. A) Vista geral da espiguetas (ep) da inflorescência em estágio de formação; B) Seção longitudinal do botão floral evidenciando ovário (Seta) e o estilete (es) e estigma. Barras: A= 0,5mm; B= 300µm

O híbrido CTP 07124 também apresentou uma peculiaridade em relação aos outros híbridos analisados, a presença de duplo ovário, como é possível observar na figura 6.4.

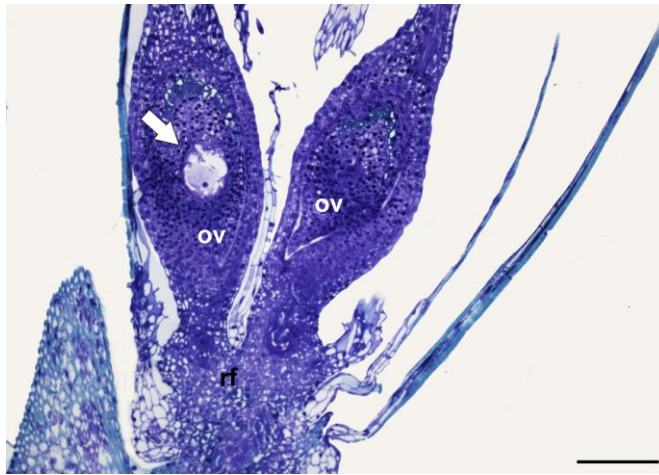


Figura 6.4 - *Saccharum x officinarum*, híbrido CTP 07124. Secção longitudinal da flor evidenciando duplo ovário (ov), o saco embrionário (seta). Inserção dos ovários no receptáculo floral (rf). Barra: 150 μ m

Nas amostras do híbrido CTEP07148 também foram encontradas espiguetas hermafroditas e femininas (ginomonoiccia; Figura 6.5; Figura 6.6).

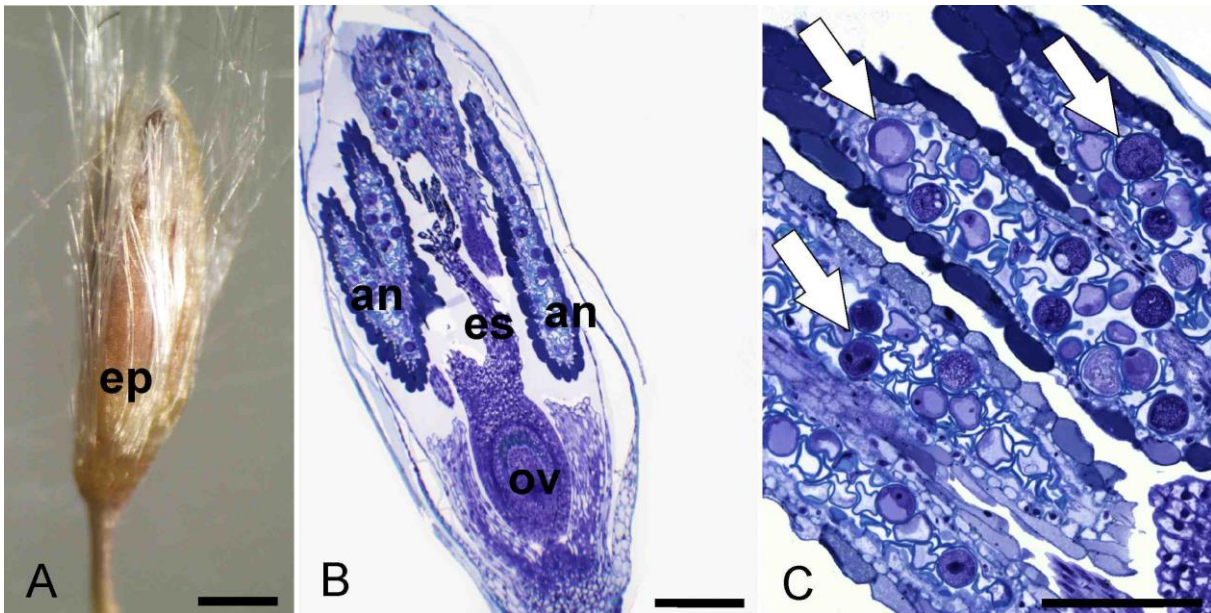


Figura 6.5 - *Saccharum x officinarum* híbrido CTEP07148. A) Vista geral da espiguetta (ep) em desenvolvimento; B-C) Secção longitudinal do botão floral evidenciando ovário (ov), estilete (es) e anteras (an); detalhe das anteras contendo grãos de pólen (Seta). Barras: A= 0,5mm; B= 300 μ m; C= 150 μ m

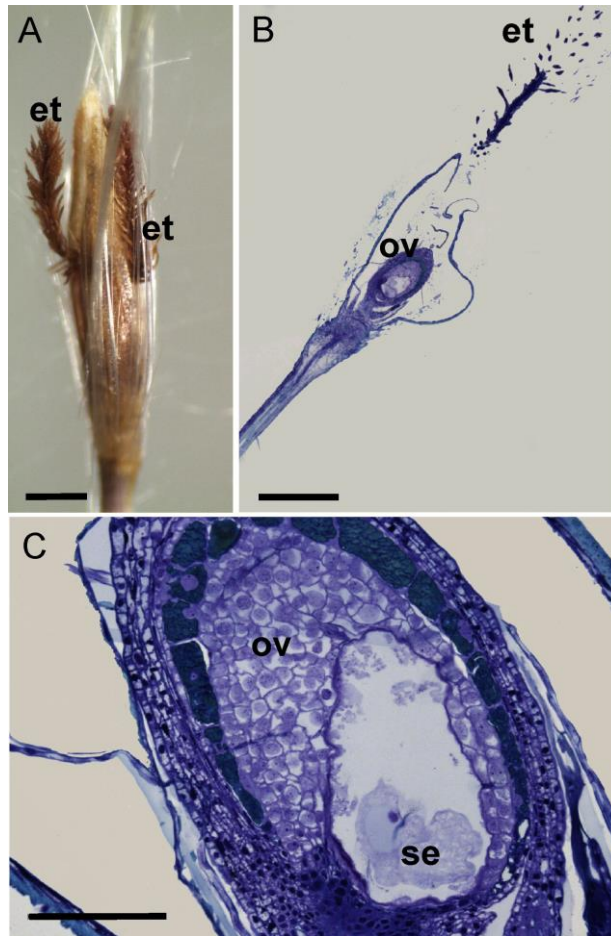


Figura 6.6 - *Saccharum x officinarum* híbrido CTEP07148 - A) Vista geral da flor na antese, evidenciando os estigmas (et); B-C) Secção longitudinal da flor evidenciando ovário (ov), o estigma (et) e o saco embrionário (se). Barras: A= 0,5mm; B= 600µm; C= 150 µm

Similarmente aos híbridos CTEP07124 e CTEP07148, as amostras do híbrido RB937570 apresentam espiguetas hermafroditas e exclusivamente femininas (ginomonoiccia; Figura 6.7 A, B).

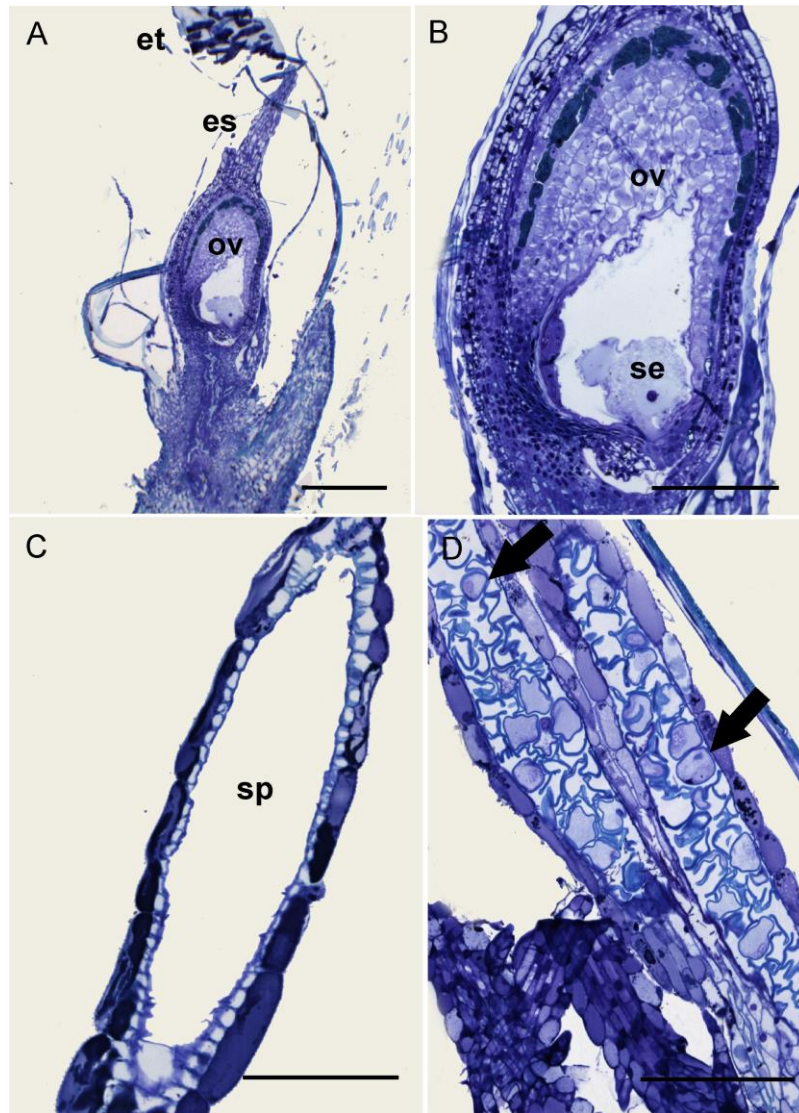


Figura 6.7 – *Saccharum x officinarum* híbrido RB937570. A) Secção longitudinal da flor evidenciando ovário (ov), o estilete (es), e o estigma (et). B) Detalhe do ovário demonstrando o saco embrionário (se). C) Detalhe da antera, sem a presença de grãos de pólen no saco polínico (sp). D) Antera com presença de grãos de pólen (Seta) no saco embrionário. Barras: A= 300 μ m; B-D= 150 μ m

Porém, foi observada a ocorrência de anteras sem a presença de grãos de pólen em seu interior (Figura 6.7 C), o que pode ser uma indicação de esterilidade masculina em algumas amostras, porém há a presença de grãos de pólen em amostras coletadas do respectivo híbrido (Figura 6.7 D).

No híbrido SP813250 (Figura 6.8) são encontradas apenas espiguetas hermafroditas (Figura 6.9), porém parece ocorrer o fenômeno da protoginia, em que o gineceu emerge antes do androceu (Figura 6.8 B).



Figura 6.8 – Espigueta de cana-de-açúcar da híbrido SP813250. A) Espigueta (ep) de cana-de-açúcar fechada. B) Botão floral em pré-antese. Estigmas (et) em desenvolvimento (Protoginia). C) Espigueta hermafrodita aberta em antese. Evidenciando o estigma (et) e as anteras (an) Barras: A-C= 0,5mm

A protoginia é um mecanismo normalmente associado à evitar a autogamia, em que os estigmas, amadurecem antes que as anteras, têm uma maior probabilidade de serem polinizados por outra planta (HOC & GARCIA, 1998).

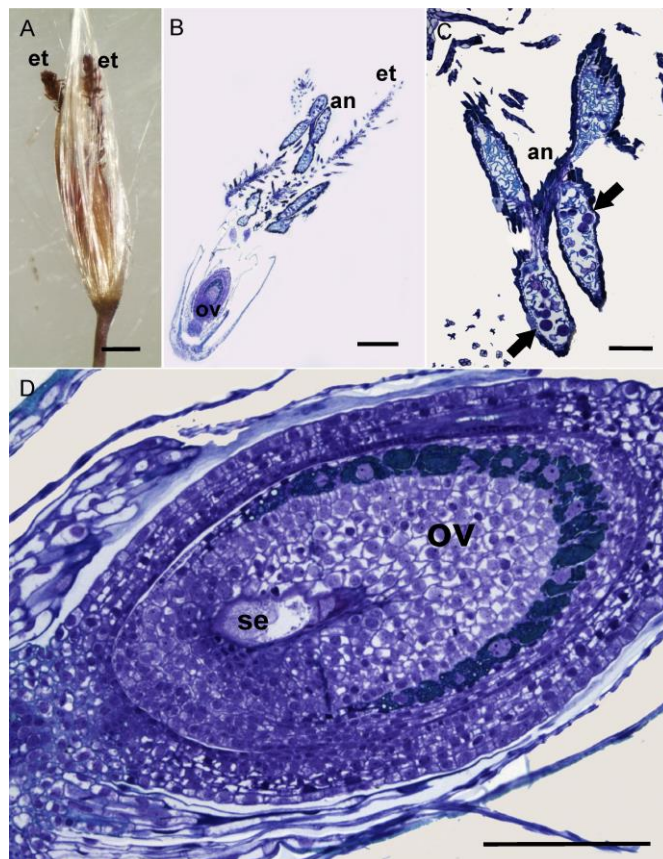


Figura 6.9 - *Saccharum x officinarum* híbrido SP813250. A) Vista geral da flor na antese evidenciando o estigma (et); B-D) Secção longitudinal da flor evidenciando ovário (ov) e o saco embrionário (se), estigma (et) e anteras (an); detalhe das anteras contendo grãos de pólen (Seta). Barras: A= 0,5mm; B= 600µm; C-D= 150 µm

Nos híbridos RB855453, RB855156, RB966928 e SP89-1115 todas as espiguetas encontradas foram hermafroditas.

No híbrido RB855453 as anteras se desenvolvem antes dos estigmas do gineceu (Figura 6.10 B), fenômeno chamado de protandria. A protandria, assim como a protoginia, promove o cruzamento e tende a evitar a autogamia (GOLLEY, 1983).

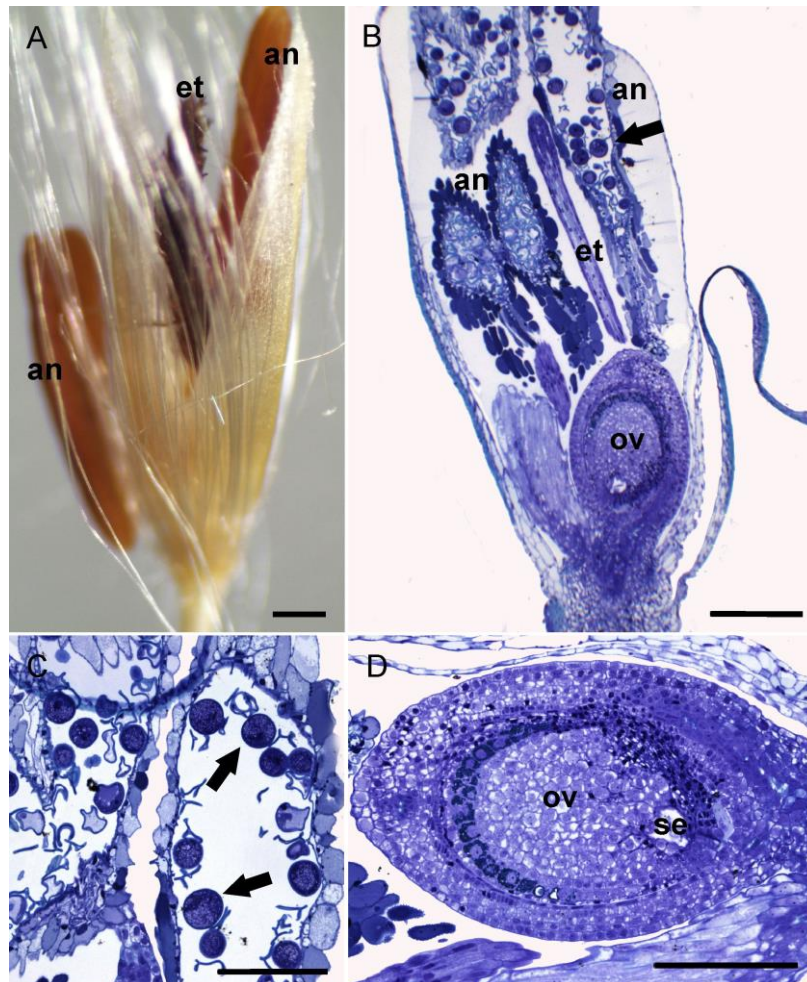


Figura 6.10 – *Saccharum x officinarum* híbrido RB855453. A) Vista geral da flor na antese demonstrando os estigmas (et) e as anteras (an). B-C) Seção longitudinal da flor evidenciando ovário (ov) e anteras (an) contendo grãos de pólen (gp). es: estigma. D) Detalhe do interior do ovário (ov) e do saco embrionário (se). Barras: A= 0,5mm; B= 300µm; C,D= 150 µm

Em algumas espiguetas do híbrido RB855156, observou-se protoginia (Figura 6.11 A, B) enquanto que, em outras amostras, as espiguetas eram homogâmicas, ou seja, desenvolviam o gineceu e o androceu sincronicamente (Figura 6.11 C, D), o que permite a autogamia.

Foi encontrada formação de sementes no híbrido de cana-de-açúcar RB855156 (Figura 6.12) na região centro-sul do país, o que indica também a viabilidade de grãos de pólen para este híbrido.

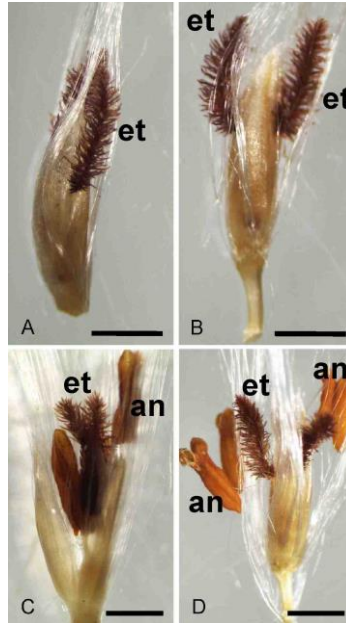


Figura 6.11 – Diferentes estágios de desenvolvimento floral de cana-de-açúcar do híbrido RB855156. A-B) Espigueta protoginica de cana-de-açúcar em abertura evidenciando os estigmas (et). C-D) Espigueta hermafrodita de cana-de-açúcar em antese evidenciando os estigmas (et) e as anteras (an). Barras: A-C=1 mm; D=2mm

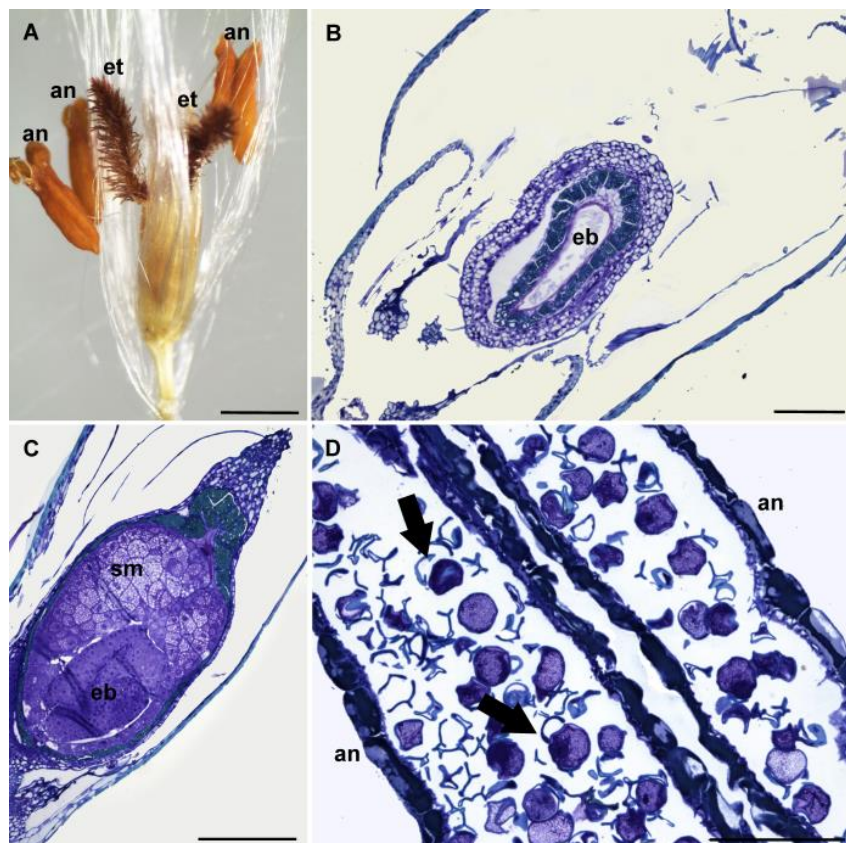


Figura 6.12 – *Saccharum x officinarum* híbrido RB855156. A) Vista geral da flor na antese (Anteras: an; Estigmas: et). B-C) Secção longitudinal da flor demonstrando o ovário com cavidade seminal e semente (sm) com embrião (eb) em início de desenvolvimento. D) Anteras (an) contendo grãos de pólen (Seta). Barras: A= 1mm; B,D= 150µm; C= 300 µm

No híbrido RB966928, o gineceu e o androceu se desenvolvem concomitantemente (homogamia) (Figura 6.13 B). As anteras do híbrido analisadas apresentaram grãos de pólen em abundância (Figura 6.13D) em relação aos outros híbridos analisados (Figura 6.9 C; Figura 6.10 C; Figura 6.12 D).

O híbrido SP89-1115 apresenta quantidade reduzida de pólen (Figura 6.14 C) em relação à RB966928 (Figura 6.13 D), e aos outros híbridos hermafroditas analisados (Figura 6.9 C; Figura 6.10 C, Figura 6.12 D), indicando variação para esse caráter.

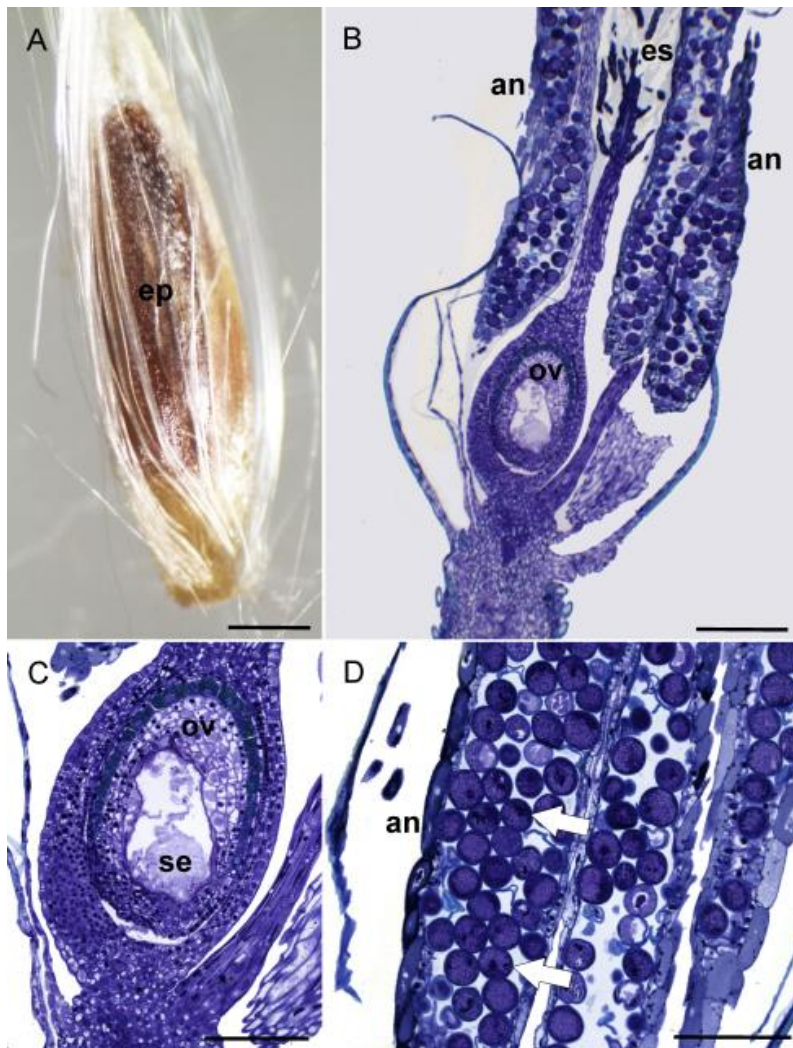


Figura 6.13 – *Saccharum x officinarum* híbrido RB966928. A) Vista geral da espiguetta (ep) em pré-antese. B-C) Secção longitudinal da flor evidenciando o saco embrionário (se) do óvulo (ov) e o estilete e os estigmas (es). D) Anteras (an) contendo grãos de pólen (Seta). Barras: A= 0,5mm; B= 300µm; C,D= 150 µm

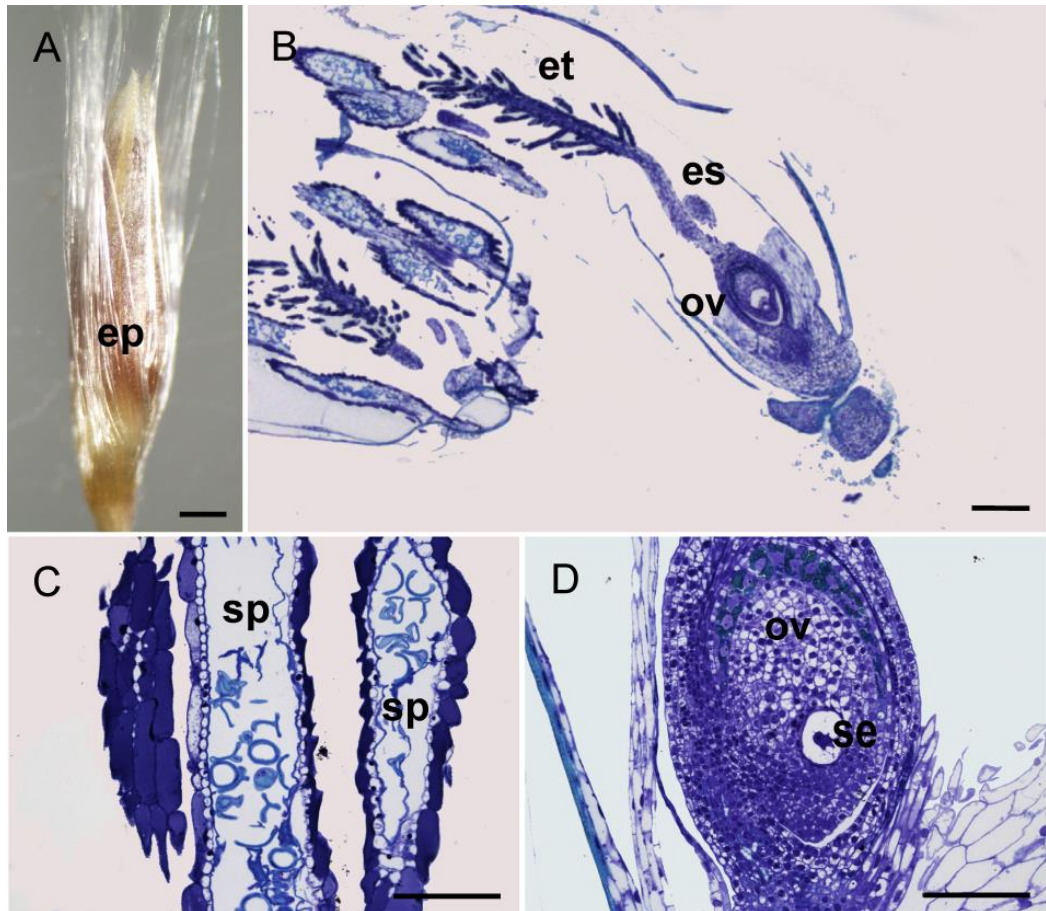


Figura 6.14 – *Saccharum x officinarum* híbrido SP89-1115. A) Vista geral da espiguetta (ep). B-C) Secção longitudinal da flor evidenciando o ovário (ov) e o estigma (et) e o estilete (es). C) Sacos polínicos (sp) sem conter grãos de pólen. D) Detalhe do saco embrionário (se) e do óvulo (ov). Barras: A= 0,5mm; B= 300µm; C,D= 150 µm

Portanto, é passível de se encontrar na região Centro-Sul do Brasil características reprodutivas dos híbridos de cana-de-açúcar também encontradas na região Nordeste do Brasil, mesmo com as condições ambientais adversas. Quando os híbridos Caiana, Riscada e Manteiga de cana-de-açúcar foram introduzida na região Centro-Sul, com o tempo, aqueles híbridos tendiam à não ocorrer o florescimento. Pois, eram selecionadas e reproduzidas vegetativamente, com objetivo, dentro outros, de não ocorrer o florescimento na cultura, afim de não comprometer a produtividade da cultura. Os atuais híbridos são recentes e produzidos a partir do melhoramento de genitores que tendem a florescer e produzir híbridos a partir das sementes (JORDÃO JUNIOR, 2009). Portanto, é natural que esses híbridos tenham maior aptidão para o florescimento nessa região e que possam também produzir sementes e pólenes viáveis, mesmo não estando nas regiões de maior afinidade climática, a partir de reprodução vegetativa, essa tendência em florescer pode vir a diminuir progressivamente como as antigos híbridos introduzidos na região (DE ALMEIDA et al., 1945).

No que diz respeito à viabilidade dos grãos de pólen dos híbridos de cana-de-açúcar (SP89-1115; SP813250; RB855156; RB855453; RB966928 e RB937570), todas as amostras analisadas mostraram grãos de pólen viáveis (Figura 6.15; Figura 6.16).

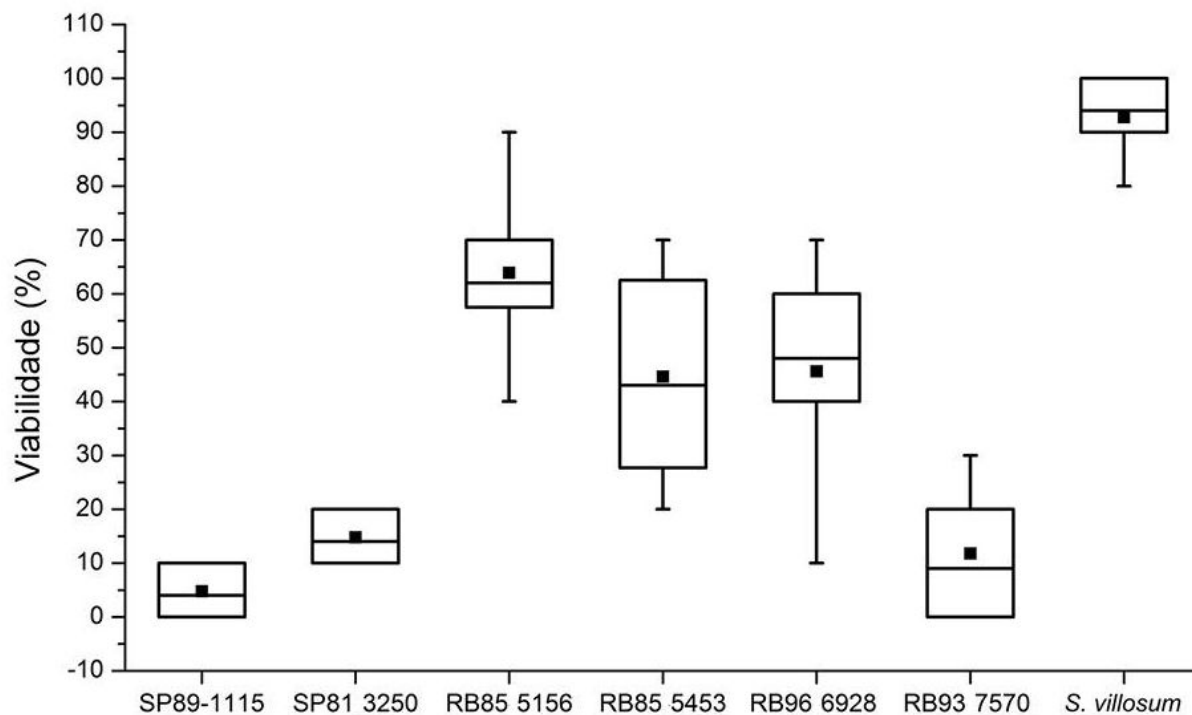


Figura 6.15 - Gráfico de box-plot, representando a porcentagem (%) de viabilidade dos grãos de pólen dos híbridos de cana-de-açúcar (*Saccharum x officinarum*): SP89-1115; SP813250; RB855156; RB855453; RB966928; RB937570 e de *Saccharum villosum* Steud. utilizando o corante citológico de Alexander (ALEXANDER, 1980)

Os híbridos RB855453 e SP89-1115 obtiveram maior e menor porcentagem de pólen viável respectivamente (Figura 6.15; Figura 6.16 A, C) em comparação com os híbridos analisados. Em três híbridos analisados (RB855156; RB855453; RB966928), a porcentagem de grãos de pólen viáveis obtidos em pelo menos um quadrante atingiu 70%. Em contrapartida, em apenas dois híbridos (SP89-1115 e RB937570) foram analisados quadrantes em que pelo menos um deles não mostrou nenhum pólen viável. Os híbridos SP89-1115; SP813250 tiveram resultados muito baixos que ficaram entre 0 e 20% de pólen viável nos quadrantes observados (Figura 6.15).

Baixas latitudes são associadas com maior viabilidade polínica em cana-de-açúcar. Na região centro-sul do Brasil a viabilidade do pólen de cana-de-açúcar é bastante variável, e atingiu o máximo de 62% de viabilidade no híbrido RB855156. Porém, nenhum dos híbridos atingiu o mínimo de 0% de viabilidade polínica no total, de modo que a transferência de pólen para as espécies selvagens é possível em todos os casos.

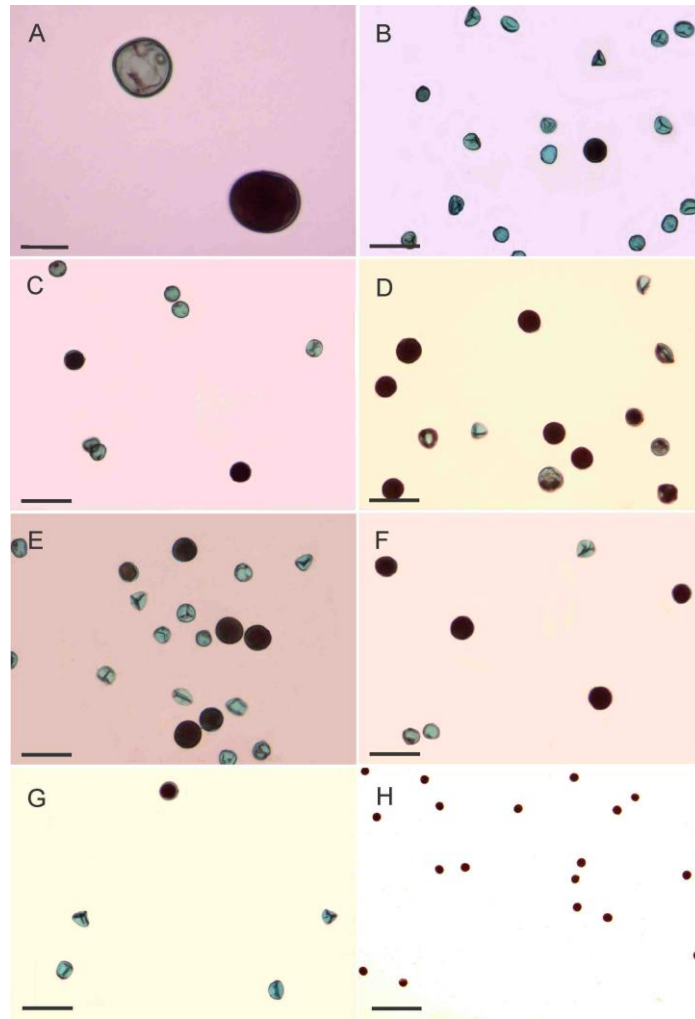


Figura 6.16 - Representação da proporção encontrada de viabilidade polínica dos seis híbridos de cana-de-açúcar utilizando solução de Alexander (ALEXANDER, 1980). A) Representação do pólen viável (vermelho) e inviável (verde). B) Híbrido de cana-de-açúcar SP89-1115. C) Híbrido de cana-de-açúcar SP813250. D) Híbrido de cana-de-açúcar RB855156. E) Híbrido de cana-de-açúcar RB855453. F) Híbrido de cana-de-açúcar RB966928. G) Híbrido de cana-de-açúcar RB937570. H) Representação da viabilidade dos grãos de pólen de *S. villosum*. Barras: A=50 µm; B-G= 100 µm H=200 µm

De acordo com os resultados obtidos sobre a viabilidade dos grãos de pólen de híbridos de cana-de-açúcar analisados e a sexagem realizada a fim de se obter informações sobre a possibilidade de reprodução em híbridos comerciais cultivados na região centro-sul do Brasil, é possível notar que há possibilidade de reprodução entre cultivares assim como a possibilidade de fertilização dos grãos de pólen no parental selvagem *S. villosum* devido à viabilidade de grãos de pólen encontrada nos híbridos e ao comportamento alógamo já identificado anteriormente na espécie selvagem. Como já mencionado, o período reprodutivo dos híbridos comercializados de cana-de-açúcar na região centro-sul ocorre no período de abril à junho.

Essas conclusões irão contribuir para que seja delimitada, caso exista fluxo gênico viável entre as espécies de *Saccharum*, as chamadas zonas de exclusão, atualmente muito utilizadas em cultivares de algodão transgênicos baseadas em pesquisas prévias de fluxo gênico

(BARROSO et al., 2005). Tais zonas de exclusão visa preservar as espécies nativas e delimitar quais regiões devem ser proibidas para o plantio de cultivares geneticamente modificadas, de modo que não ocorram riscos de fluxo gênico interespecíficos.

S. villosum é atualmente considerada uma espécie do gênero *Saccharum* mas anteriormente pertenciam ao gênero *Erianthus* taxonomicamente (WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012). Levando-se em consideração as características reprodutivas e taxonômicas semelhantes de *Erianthus* em relação à cultivares de cana-de-açúcar, é possível encontrar na literatura trabalhos de introgressão gênica do gênero *Erianthus* (*E. arundinaceus*) para o gênero *Saccharum* com o objetivo de melhorar as cultivares de cana-de-açúcar (BESSE et al., 1997; BESSE & MCINTYRE, 1999). Assim, podendo indicar afinidade reprodutiva entre ambos os gêneros.

6.4 Conclusão

Podemos concluir que o florescimento dos híbridos de cana-de-açúcar (*Saccharum x officinarum*) é extremamente influenciado por condições ambientais como temperatura, umidade e luz, além de causar danos a produtividade agrícola. O mesmo ocorre com as sementes, que para germinarem necessitam de condições ideais como elevada temperatura e umidade do solo. Sendo assim, a reprodução sexual seria fortemente prejudicada em locais que possuem um outono quente e períodos de seca, como é o caso da região canavieira do Centro-sul do Brasil. A literatura sugere que, mesmo ocorrendo florescimento acentuado em alguns anos agrícolas, as condições não seriam ideais para a viabilidade do pólen, para o desenvolvimento de sementes e, conseqüentemente, para a germinação das mesmas na região Centro-Sul. Os resultados indicam que o pólen é viável, porém a taxa de desenvolvimento do tubo polínico é menor que a encontrada no Nordeste. Outro ponto que chama a atenção é a presença de algumas sementes nas inflorescências de algumas cultivares. Dessa forma, a Resolução Normativa nº 05 (CTNBio, 2008) não será cumprida na sua integralidade, pois existe a possibilidade de escape gênico. Neste caso, a aplicação do princípio da precaução do Direito Ambiental (Art. nº 225 da Constituição Federal de 1988) se faz necessário, visando implementar medidas prévias para a preservação ambiental.

Referências

- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain technology**, Baltimore, US, p. 13–18, 1980.
- AMARAL, A. L.; SANTOS, J. M.; CÂMARA, T. M. M.; BARBOSA, G.V. S. **Metodologia de Conservação de Pólen de Cana-de-açúcar**, Aracaju, SE, p. 1-11, 2012. (EMBRAPA Comunicado Técnico 127).
- BARROSO, P.A.V.; FREIRE, E.C.; DO AMARAL, J.A.B.; SILVA, M.T. **Zonas de exclusão de algodoeiros transgênicos para preservação de espécies de *Gossypium* nativas ou naturalizadas**. Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, 2005. p. 1-7.
- BESSE, P.; MCINTYRE, C. L. Chromosome *in situ* hybridisation of ribosomal DNA in *Erianthus* sect. *Ripidium* species with varying chromosome numbers confirms $x=10$ in *Erianthus* sect. *Ripidium*. **Genome**, Ottawa, CA, v. 42, n. 2, p. 270-273, 1999.
- BESSE, P.; MCINTYRE, C. L.; BERDING, N. Characterisation of *Erianthus* sect. *Ripidium* and *Saccharum* germplasm (Andropogoneae-Saccharinae) using RFLP markers. **Euphytica**, Berlin, v. 93, n. 3, p. 283-292, 1997.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H.M.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; FILGUEIRAS, T.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E. DA SILVA, W.J.; SILVA FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, Berlin, v. 4, n. 1, p. 62–89, 2011.
- DE ALMEIDA, J.R.; VALSECCHI, O.; GOMES, F.P. O florescimento da cana de açúcar. **Análise**, Piracicaba, v. 285, p. 87, 1945.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, New York, NY, v. 55, p. 123-142, 1968.
- HARLAN, J.R. **Crops and man**. Madison, WI: American Society Agronomy, 1975. 295p.
- HAYGOOD, R.; IVES, A. R.; ANDOW, D. A. Consequences of recurrent gene flow from crops to wild relatives. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, UK, v. 270, n. 1527, p. 1879-1886, 2003.
- HOC, P. S.; GARCIA, M. T. A. Biología floral y sistema reproductivo de *Phaseolus vulgaris* var. Aborigineus (Fabaceae). **Revista de Biología Tropical**, San José, CR, v. 47, n. 1, p. 35-42, 1998.
- JORDÃO JUNIOR, H. **Desenvolvimento em um Sistema baseado em marcadores moleculares de DNA do tipo microssatélites para identificação de acessos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2009. 111p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de Campinas, Campinas, SP, 2009.

GOLLEY, F. B. **Tropical rainforest ecosystems structure and function**. Amsterdam: Hardcover, 1983. p. 189-216.

WELKER, C. A. D.; LONGHI-WAGNER, H. M. The genera *Eriochrysis* P. Beauv., *Imperata* Cirillo and *Saccharum* L. (Poaceae - Andropogoneae - Saccharinae) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal Botany**, Porto Alegre, RS, v.35, n.1, p. 87-105, 2012.

7 MORFOLOGIA POLÍNICA DE *Saccharum villosum* Steud

Resumo

Na família Poaceae há estudos de palinologia em diferentes espécies, incluindo as do gênero *Saccharum* sp. Tais pesquisas descrevem os grãos de pólen de espécies selvagens e cultivadas de *Saccharum* sp. destacando sua importância taxonômica. Estudos com *Saccharum villosum* são necessários para a realização de cruzamentos interespecíficos envolvendo espécies do gênero, e a descrição morfológica das partes florais, incluindo o pólen, constituem conhecimento básico para qualquer pesquisa em biologia reprodutiva e hibridação. Os grãos de pólen de *S. villosum* foram caracterizados morfológicamente utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de luz. Para as análises morfométricas o pólen foi submetido à acetólise láctica. Os grãos de pólen foram medidos utilizando-se o *software* ImageJ[®]. Os grãos de pólen apresentam diâmetro polar de $37,052 \pm 1,7251\mu\text{m}$ e diâmetro equatorial de $36,429 \pm 1,7107\mu\text{m}$ com forma prolato-esferoidal. A exina tem tamanho $0,811 \pm 0,15\mu\text{m}$, a sexina $0,572 \pm 0,1094\mu\text{m}$ e a nexina $0,2348 \pm 0,062\mu\text{m}$. Os grãos de pólen são isolados em mônades e contêm apenas uma abertura circular, razão pela qual dizem-se de abertura monoporada com poro circular. Os grãos de pólen monoporados, com poros de formato oval, são típicos das monocotiledôneas. A ornamentação da exina pode ser considerada levemente escabrada e se assemelha à de *S. officinarum*. O pólen de *S. villosum* tem características morfológicas correspondentes ao encontrado em espécies de *Saccharum* e na família Poaceae como um todo. Portanto, dificilmente as dimensões do pólen de *S. villosum* seriam empecilho para cruzamentos interespecíficos envolvendo híbridos de cana-de-açúcar (*S. x officinarum*).

Palavras-chave: Grãos de pólen; Microscopia; Ornamentação da exina

Abstract

In the Poaceae family, there are studies of palynology in different species including *Saccharum* sp. These studies describe the pollen of wild and cultivated species of *Saccharum* sp., emphasizing its taxonomic significance. However, studies with *S. villosum* are required to perform interspecific crosses between species of the genus. The pollen grains of *S. villosum* were characterized morphologically using scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and light microscopy. For morphometric analysis, pollen grains underwent lactic acetolysis. The measurements of the pollen grains were done using the ImageJ[®] software. Pollen grains presented polar diameter of $37.052 \pm 1,7251\mu\text{m}$ and equatorial diameter of $36.429 \pm 1,7107\mu\text{m}$, and a prolate-spheroidal shape. The exine measures $0.811 \pm 0,15\mu\text{m}$, the sexine $0.572 \pm 0,11\mu\text{m}$ and the nexine $0.2348 \pm 0,06\mu\text{m}$. The pollen grains are isolated in monads and contain only a circular opening, so they are said to have a monoporate opening with a circular pore. The monoporate pollen grains, with an oval pore, are typical of monocots. The ornamentation of the exine can be considered slightly scabrous and resembles *S. officinarum*. The pollen of *S. villosum* has morphological characteristics corresponding to the pollen found in species of *Saccharum* and of the Poaceae family as a whole. Therefore, *S. villosum* pollen dimensions would hardly be a hindrance to interspecific crosses involving sugar cane hybrids (*S. x officinarum*).

Keywords: Pollen grains; Microscopy; Ornamentation of exine

7.1 Introdução

Na família Poaceae há estudos de palinologia em diferentes espécies incluindo *Saccharum* sp. Os grãos de pólen da família, via de regra, são monoporados, porém a ornamentação da exina pode variar, sendo, na maioria das vezes, microrreticulada; o tamanho do grão pode variar de 25 a 50 μm de diâmetro (RADAESKI et al., 2013).

Um dos primeiros estudos acerca da morfologia dos grãos de pólen de *Saccharum* sp. foi relatado por Krishnamurthi (1980), utilizando microscopia de varredura. Ele observou que os grãos de pólen de *Saccharum* são monoporados e sua exina é dotada de espículas agrupadas de forma irregular separadas por fissuras estreitas.

Chaturvedi & Datta (2001) estudaram a morfologia polínica de quatro espécies de *Saccharum* sp., duas espécies cultivadas (*S. officinarum* e *S. sinense*) e duas selvagens (*S. robustum* e *S. spontaneum*) utilizando Microscopia de luz (ML) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os autores encontraram padrões da superfície da exina com importância taxonômica nas quatro espécies. *S. officinarum* se caracteriza por conter a superfície da exina granulosa com os grânulos dispostos em grupos. *S. sinense* e outras espécies cultivadas têm o padrão de exina tuberculada-baculada. *S. officinarum* é adaptada para condições tropicais e *S. sinense* para condições subtropicais e temperadas. As espécies selvagens estudadas têm o padrão de exina insular coberta por espículas arredondadas. Em *S. robustum* ela forma um padrão de mosaico e em *S. spontaneum* as espículas são esparsas. *S. robustum* é considerada próxima evolutivamente de *S. spontaneum* e, portanto, apresentam uma característica em comum, a exina com a superfície insular. Nas quatro espécies estudadas, os grãos de pólen são característicos da família Poaceae, sendo eles monoporados anelados. Quanto ao tamanho dos pólenes, os autores concluíram que *S. robustum* e *S. officinarum*, têm tamanho maior (*S. robustum* $\mu=45\mu\text{m}$ e *S. officinarum* $\mu=46,5\mu\text{m}$) do que *S. sinense* ($\mu=42\mu\text{m}$) e *S. spontaneum* ($\mu=36\mu\text{m}$).

Porém, ainda não há informações sobre os grãos de pólen de *Saccharum villosum* Steud, a ornamentação de sua exina e suas dimensões. Como mencionado anteriormente, tais informações são importantes na análise de viabilidade de polinização entre a espécie em questão e seus parentes cultivados (*Saccharum x officinarum*) (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Visto que a espécie pertencia a outro gênero (*Erianthus*), é interessante compará-la a outras espécies de *Saccharum* para entender porque os padrões encontrados na espécie a fizeram ser reclassificada neste gênero.

7.2 Material e Métodos

Os grãos de pólen de *S. villosum* provenientes de espiguetas no estágio de antese foram caracterizados morfológicamente através do microscópio eletrônico de varredura de pressão variável LEO 435 VP (MEV), microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e microscópio de luz.

A preparação das amostras se iniciou com a coleta dos estames que, logo após, foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada [glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), CaCl_2 (0,001 M), tampão cacodilato de sódio (0,05 M), em pH 7,2] (DE SOUZA, 2013). Para a realização de medições para estimar o tamanho dos grãos de pólen, os quais foram coletados e armazenados em tubos eppendorf, 25 grãos de pólen tomados ao acaso foram submetidos à acetólise láctica (ACLAC 40), seguindo a metodologia de Raynal & Raynal (1979). Os grãos de pólen acetolisados foram fotografados em microscópio óptico e medidos utilizando o *software* ImageJ[®]. A forma do pólen foi determinada utilizando o quociente (Diâmetro Polar/Diâmetro Equatorial).

Para a visualização do material através do microscópio eletrônico de varredura, as amostras foram desidratadas em série crescente de concentração de acetona a 35, 50, 70, 90 e 100% por 15 minutos cada e 2h e 30 minutos na acetona 70%. Em seguida, as amostras foram secas em HMDS (hexametildisilazano) e metalizadas em “stubs” (placas metálicas) com uma fina camada de ouro.

Para a análise no microscópio eletrônico de transmissão, os grãos de pólen foram lavados também com tampão cacodilato de sódio (0,1 M) e pós-fixados com tetróxido de ósmio (1%) por 1 hora. Em seguida, as amostras foram lavadas com solução salina (0,9%) e pré-corados com acetato de uracila (2,5%). A infiltração foi em resina Spurr e o emblocamento foi em resina pura por 48 horas, a 70°C. Os blocos foram seccionados em ultramicrótomo (Sorvall Porter Blum MT2, Norwalk, USA). Posteriormente, as secções foram colocadas em grades de cobre recobertas com Formvar[®] e contrastadas em citrato de chumbo e acetado de uracila (REYNOLDS, 1963).

As análises morfométricas dos grãos de pólen foram realizadas com a exina e a intina de 10 amostras e 10 medidas em cada amostra, pois as medidas podem variar muito dentro de um único pólen. A exina foi dividida em duas estruturas, sexina e nexina, para a realização das medidas. Dentro da sexina foram consideradas mais duas estruturas, o teto e a columela.

As medidas foram realizadas utilizando o *software* ImageJ 1.46r (RASBAND, 2012) e as análises descritivas foram realizadas utilizando estatística descritiva através do programa Genes 2009.7.0 (CRUZ, 2006).

A caracterização da ornamentação polínica de *S. villosum* foi realizada utilizando a nomenclatura conforme Punt et al. (2007) e Hesse et al. (2009).

7.3 Resultados e Discussão

As características morfológicas dos grãos de pólen de *Saccharum villosum* correspondem às características polínicas encontradas no gênero *Saccharum* L. por Chaturvedi & Datta (2001), características que correspondem às da família Poaceae.

O pólen de *S. villosum* tem diâmetro equatorial (DE) de $36,43 \pm 1,71 \mu\text{m}$ e diâmetro polar (DP) de $37,05 \pm 1,73 \mu\text{m}$. De acordo com Erdman (1952), o pólen é considerado de tamanho médio (26 a $50 \mu\text{m}$) (Tabela 7.1).

Tabela 7.1 - Estatística descritiva mostrando os valores das médias dos diâmetros encontrados nos grãos de pólen, diâmetro mínimo observado, diâmetro máximo observado, coeficiente de variância, variância e desvio padrão das medidas encontradas nos grãos de pólen. As estruturas medidas nos grãos de pólen correspondem ao Teto (Te); Columela (Co); Sexina (Se); Nexina (Ne); Exina (Ex); Diâmetro Equatorial (DE), Diâmetro Polar (DP)

| Est. descritiva | Te (μm) | Co (μm) | Se (μm) | Ne (μm) | Ex (μm) | DE (μm) | DP (μm) |
|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Média | 0,382 | 0,157 | 0,572 | 0,235 | 0,811 | 36,429 | 37,052 |
| Mínimo | 0,072 | 0,021 | 0,299 | 0,120 | 0,557 | 33,530 | 32,150 |
| Máximo | 0,677 | 0,285 | 0,847 | 0,425 | 1,218 | 39,740 | 39,121 |
| CV | 22,269 | 0,373 | 19,131 | 26,583 | 18,481 | 4,695 | 4,655 |
| Variância | 0,017 | 0,003 | 0,012 | 0,004 | 0,023 | 2,926 | 2,976 |
| Des. Padrão | 0,129 | 0,059 | 0,109 | 0,062 | 0,150 | 1,710 | 1,725 |

O tamanho do pólen de *S. villosum*, se comparado com outras espécies de *Saccharum* descritas por Chaturvedi & Datta (2001), é similar ao de *S. spontaneum* e suas dimensões são quase que idênticas (Tabela 7.2).

Tabela 7.2 - Caracterização dos pólenes e ornamentação das exinas em cinco espécies de *Saccharum* L. (*Saccharum officinarum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. spontaneum* e *S. villosum*). Em cada espécie destaca-se a descrição do tipo de pólen, tamanho do pólen, tamanho da exina e ornamentação da exina. **Tabela adaptada de Chaturvedi & Datta (2001)**

| Espécie | Tipo de pólen | Tamanho do pólen (µm) | Tamanho da exina (µm) | Ornamentação da exina | Características particulares |
|-----------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| <i>S. officinarum</i> | 1-porado-anelado | 46,5 (35-57) | 2-3 | Granuloso | Grânulos livres agrupados |
| <i>S. robustum</i> | 1-porado-anelado | 45 (40-62) | 2 | Insular | Insular coberto com espículas de pontas arredondadas formando um mosaico |
| <i>S. sinense</i> | 1-porado-anelado | 42 (35-50) | 2-3 | Baculada | Baculada espaçada |
| <i>S. spontaneum</i> | 1-porado-anelado | 36 (31-40) | 1,5-2 | Insular | Espículas de pontas suaves e arredondadas. |
| <i>S. villosum</i> | 1-porado-anelado | 37 (32-39) | 0,5-1,2 | Escabrada | Ornamentação com grânulos livres não arranjados em grupos |

S. villosum tem 37 (32-39) µm e *S. spontaneum* tem 36 (31-40) µm. As outras três espécies têm tamanho acima de 40 µm, sendo *S. officinarum* a espécie com pólen de maior tamanho de todas as *Saccharum* estudadas.

Considerando possíveis cruzamentos entre *S. villosum* e *S. x officinarum*, no que tange ao possível papel das dimensões dos grãos de pólen, não haveria problemas para a realização de ocasionais cruzamentos entre ambas as espécies. Outros fatores devem influenciar os resultados de um cruzamento, no entanto, inclusive a compatibilidade ou incompatibilidade citogenética, a qual ainda deve ser investigada e pesquisada mais a fundo.

Os grãos de pólen de *S. villosum* são isopolares por conterem os polos distal e proximal divididos em partes iguais pelo plano equatorial.

Em relação à forma do pólen, a razão entre o diâmetro equatorial e o polar determina o formato do pólen estudado (GASPARINO & CRUZ-BARROS, 2006). Nas divisões em que o resultado se aproxima da razão 1, usa-se a seguinte classificação: para valores entre 0,89 e 1,00, o pólen é considerado oblato-esferoidal e para valores em que as razões estão entre 1,00 e 1,14, o pólen é considerado prolato-esferoidal (HESSE et al., 2009). O pólen de *S. villosum* Steud tem razão de 1,017, esse valor indica que o pólen de *S. villosum* Steud tem a forma prolato-esferoidal (Figura 7.1 e Figura 7.2 A, C).



Figura 7.1 - Grãos de pólen tratados por meio de acetólise láctica (ACLAC 40). Em destaque, evidenciam-se os poros por onde é liberado o conteúdo celular (Setas). Barra: 25 μ m

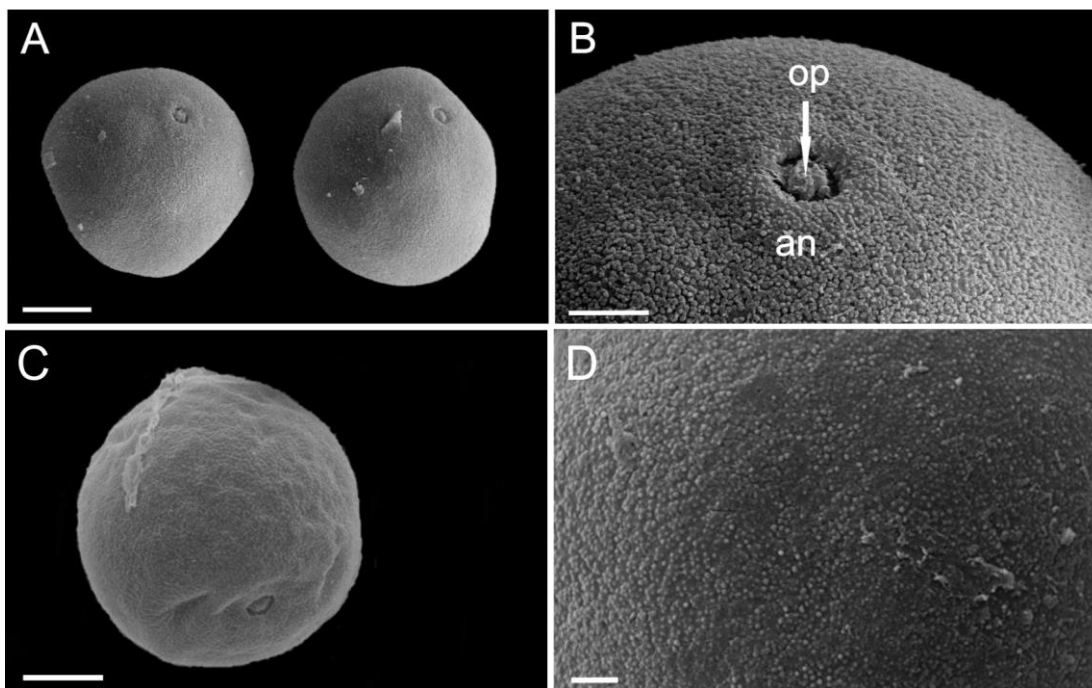


Figura 7.2 - Morfologia do pólen de *S. villosum* obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A) Pólenes de *S. villosum* em antese. B) Vista do poro do pólen, destacando o opérculo (Seta) e o ânulo. C) Vista do pólen de *S villosum* em maior aumento. D) Ornamentação da exina do pólen de *S. villosum*. Barras: A) 20 μ m; B) 3 μ m; C) 10 μ m; D= 2 μ m

Os grãos de pólen de *S. villosum* são isolados em mônades e contêm apenas uma abertura circular, portanto são denominados de monoporados com poro circular. Os grãos de pólen monoporados com formato oval, são típicos das monocotiledôneas. Supõe-se que essa forma teria dado origem aos outros tipos de pólen (OLIVEIRA, 2011) (Figura 7.2 e Figura 7.3).

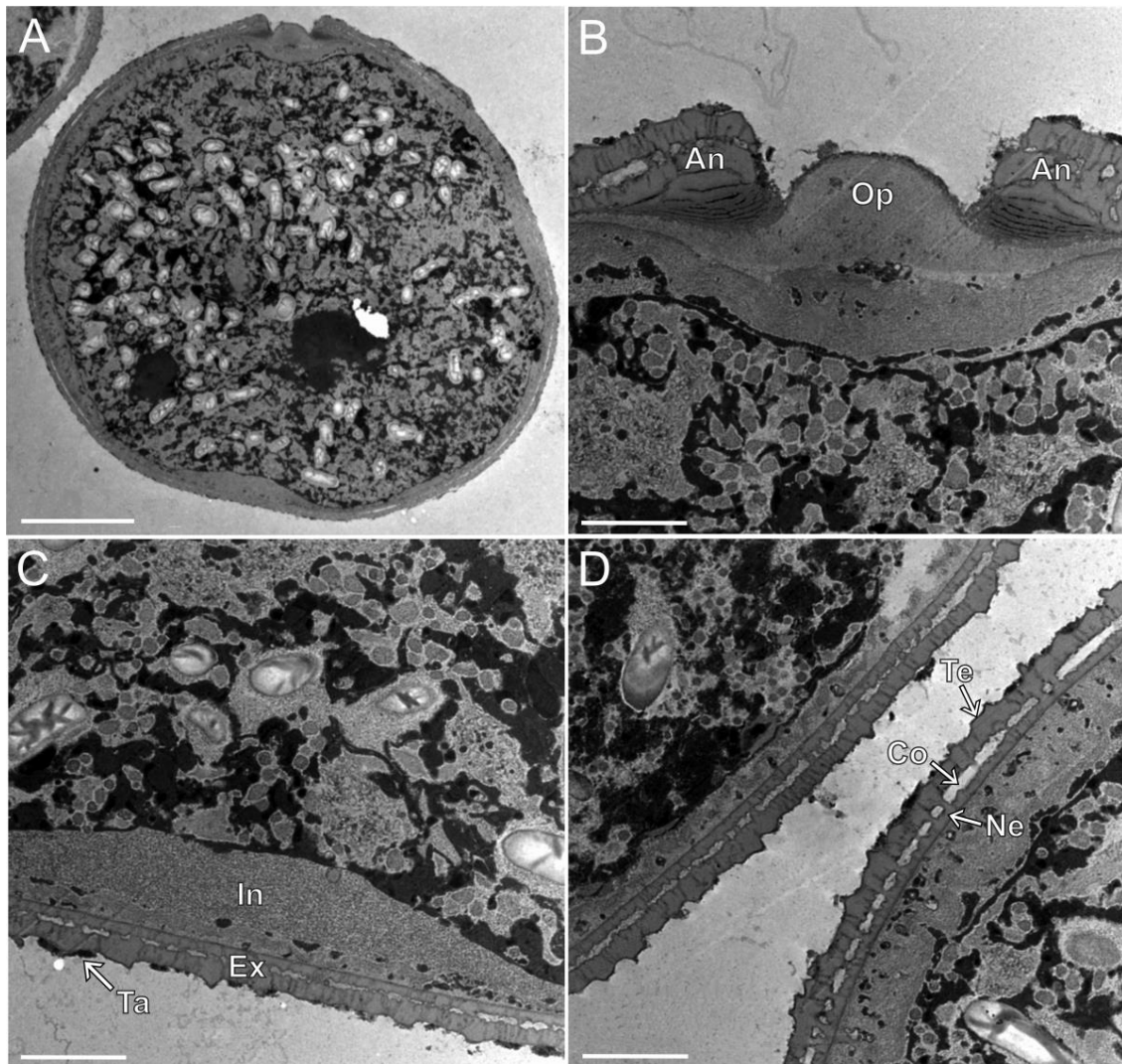


Figura 7.3 - Morfologia do pólen de *S. villosum* obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A) Corte dos grãos de pólen de *S. villosum* em antese. B) Destaque do poro do pólen de *S. villosum* Steud. An: ânulo; Op: opérculo. C) Destaque da parede do pólen de *S. villosum* Steud. Ex: exina; In: Intina; Ta: Tapete. D) Detalhe da exina do pólen de *Saccharum villosum* Steud. Ne: Nexina; Co: Columela; Te: teto. Barras: A) 10 μ m; B, C e D) 2 μ m

A ornamentação da exina pode ser considerada levemente escabrada (Figura 7.2 B, D). Distintamente dos grãos de pólen de *S. officinarum*, os grânulos encontrados em *S. villosum* não são dispostos de maneira agrupada. Os grânulos são distribuídos de maneira homogênea na superfície da exina (Figura 7.2 A, D). *Saccharum villosum* é considerado um parente selvagem da cana-de-açúcar (*S. x officinarum*) (FILGUEIRAS & WELKER, 2012), porém, a característica ornamental da exina não corresponde aos padrões encontrados na ornamentação dos parentes selvagens de *Saccharum* (*S. robustum* e *S. spontaneum*) com exceção de o tamanho ser similar ao de *S. spontaneum*. Ambas as espécies apresentam exinas com superfície insular formando um padrão de mosaico (CHATURVEDI & DATTA, 2001) (Tabela 7.2). Levando em consideração a origem das espécies, uma teoria bastante interessante diz que *S. officinarum*

teria surgido de *S. robustum*, *S. spontaneum* e também de uma espécie de *Erianthus*, *E. maximus* ou *E. arundinaceus* (BRANDES, et al., 1939; GRASSL, 1946; DUTT, 1947), o que poderia ter gerado características intermediárias entre *Saccharum* selvagens e *Erianthus*. Dessa forma, pode ser explicado o padrão de exina encontrado em *S. officinarum*, por ser a espécie que mais se equipara a *S. villosum* em relação aos padrões de ornamentação da exina, se comparado com as outras espécies de *Saccharum* (Tabela 7.2).

Com relação às medidas morfológicas do pólen de *S. villosum*, o diâmetro da exina variou entre 0,557 e 1,218 μ m, com média de 0,811 μ m \pm 0,15 (Figura 7.3 D; Figura 7.4 A e Tabela 7.1).

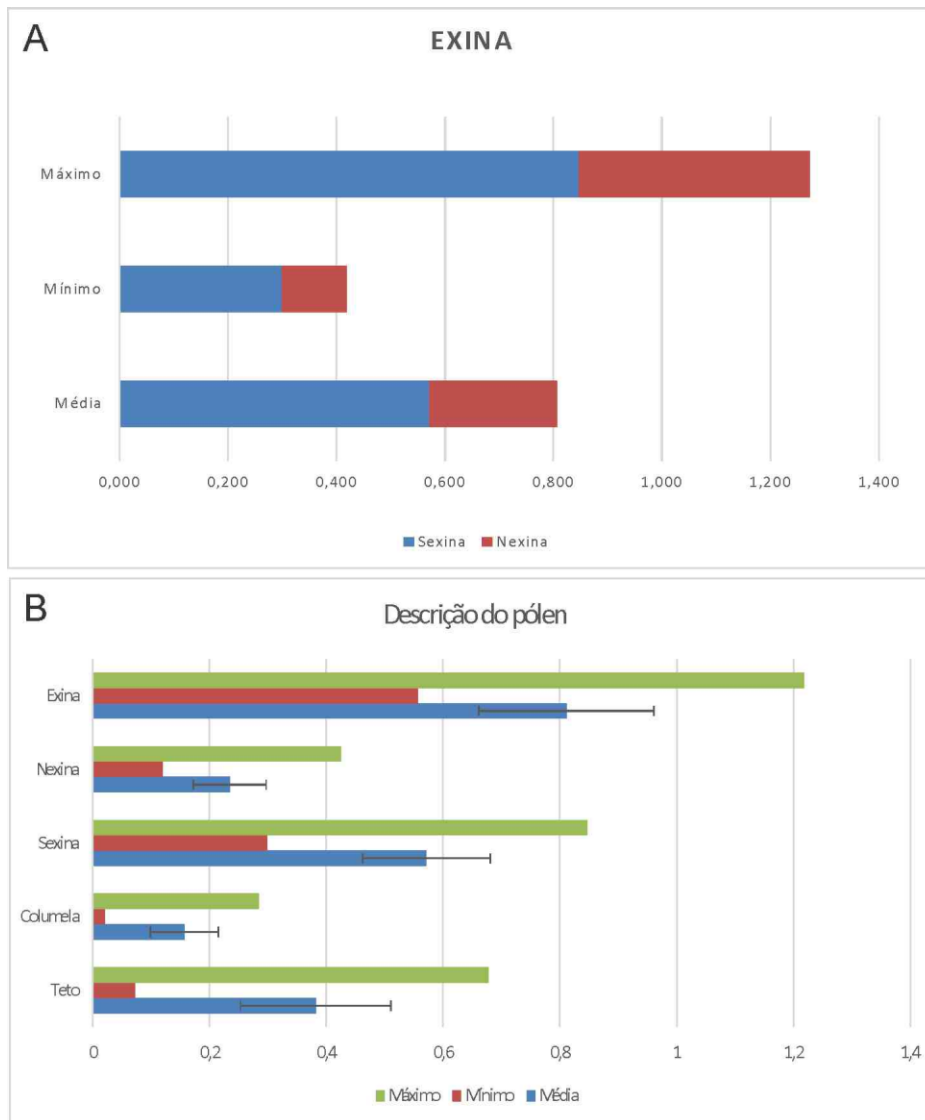


Figura 7.4 - A) Gráfico ilustrando a medida máxima, mínima e a média encontrada dentre as sexinas e nexinas medidas em todas as repetições. B) Descrição geral das estruturas do pólen de *S. villosum* destacando as medidas máximas, mínimas e a média encontrada nas cinco estruturas medidas

Se comparado com outras espécies de *Saccharum*, a exina de *S. villosum* é a que apresenta o diâmetro menor. Levando em consideração as espécies cultivadas e selvagens, as espécies cultivadas (*S. officinarum* e *S. sinense*) apresentam um espessamento maior da exina do que as espécies selvagens (*S. robustum*, *S. spontaneum* e *S. villosum*) (Tabela 7.2). A sexina apresentou um espessamento maior do que a nexina do pólen de *S. villosum* (Figura 7.4 B).

A sexina apresentou diâmetro médio de $0,572 \mu\text{m} \pm 0,1094$, variando entre 0,299 e 0,847 μm (Tabela 7.1; Figura 7.4 B) e a nexina variou de 0,12 a 0,425 μm de diâmetro com média de $0,2348 \mu\text{m} \pm 0,062$ (Tabela 7.1; Figura 7.4 B). O teto dos grãos de pólen de *S. villosum* variou de 0,072 a 0,677 μm de diâmetro (Tabela 7.1; Figura 7.4 B) com média de $0,382 \mu\text{m} \pm 0,129$ (Figura 7.4 B) e a columela tem diâmetro médio de $0,156 \mu\text{m} \pm 0,058$ (Figura 7.4 B), variando entre 0,021 e 0,285 μm (Tabela 7.1; Figura 7.4 B). Todas as medidas e características encontradas no pólen de *Saccharum villosum* Steud poderão servir para análises taxonômicas em relação às outras espécies de *Saccharum* ocorrentes no Brasil (*S. asperum* e *S. angustifolium*).

6.4 Conclusão

Os grãos de pólen de *S. villosum* tem características morfológicas correspondentes aos grãos de pólen encontrados em espécies de *Saccharum* e na família Poaceae como um todo. A ornamentação da exina se compara com a de *S. officinarum* já relatada na literatura, porém, suas dimensões se assemelham às de *S. spontaneum*. Portanto, a morfologia do pólen de *S. villosum*, não seria empecilho para cruzamentos de *S. villosum* com híbridos de cana-de-açúcar (*S. x officinarum*).

Referências

BRANDES, E. W.; SARTORIS, G. B.; GRASSL, C. O. Assembling and evaluating wild forms of sugar cane and closely related plants. In: CONGRESS INTERNATIONAL SOCIETY SUGAR CANE TECHNOLOGY PROCEEDINGS, 6., 1939, Louisiana, US. **Congress International Society Sugar cane Technology Proceedings**, 1939. p. 128-153.

CHATURVEDI, M.; DATTA, K. Pollen morphology in *Saccharum* L. (poaceae) —wild and cultivated sugar cane species: With one figure and one table. **Feddes Repertorium**, Weinheim, v. 112, n. 5-6, p. 387-390, 2001.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H.M.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; FILGUEIRAS, T.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E. DA SILVA, W.J.; SILVA FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A

Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, Berlin, v. 4, n. 1, p. 62–89, 2011.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Estatística experimental e matrizes**. Viçosa, MG: Editora UFV. 2006. 285p.

DE SOUZA, E. H. **Reprodução e hibridação interespecífica e intergenérica em bromeliáceas com potencial ornamental**. 2013. 256 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2013.

DUTT, N. L. Sugar Cane in India – a retrospect and prospect. In: PRESIDENTIAL ADDRESS IN THE SECTION OF AGRICULTURAL SCIENCES, 34., 1947. Delhi. **Indian Science Congress Agriculture section**, 1947.

ERDTMAN, G. Pollen morphology and plant taxonomy. **GFF**, Sweden, v. 74, n. 4, p. 526-527, 1952.

FILGUEIRAS, T. S.; WELKER, C. A. D. **Saccharum. Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em 19 set. 2014.

GASPARINO, E. C.; CRUZ-BARROS, M. A. V. **Palinologia: Capacitação de monitores e educadores**. São Paulo, SP: Curso de Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Instituto de Botânica, 2006. 9p.

GRASSL, C. O. *Saccharum robustum* and other wild relatives of “noble” sugar canes. **Journal Arnold Arboretum**, Cambridge, UK, v. 27, p. 234-252, 1946.

HESSE, M.; HALBRITTER, H.; ZETTER, R.; WEBER, M.; BUCHNER, R.; FROSCHE-RADIVO, A.; ULRICH, S. **Pollen Terminology. An illustrated handbook**. Berlin, 2009.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, NY, v. 27, p. 137–138, 1965.

KRISHNAMURTHI, M. Further studies on sugarcane pollen. **Proceedings International Society Sugar Cane Technology**. Manila, PH, p. 1204-1206, 1980.

OLIVEIRA, L. M.; BRUNO, R. L. A.; SILVA, K. R. G.; ALVES, E. U.; SILVA, G. Z.; ANDRADE, A. P. Qualidade fisiológica de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Jaboticabal, v. 33 n. 2, p. 289-298, 2011.

PUNT, W.; HOEN, P. P.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. Glossary of pollen and spore terminology. Second edition revised by Peter Hoen. **Review of Palaeobotany and Palynology**, Amsternam, v. 143, p. 1-81, 2007.

RADAESKI, J. N.; PEREIRA, A. B.; BAUERMAN, S. G. Morfologia polínica de espécies da família Poaceae com ocorrência no Rio Grande do Sul, Brasil. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO (SIEPE), Bagé, RS. **Anais...** Bagé, RS: SIEPE. v. 5 n. 4, 2013.

RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, US, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.

RAYNAL, A.; RAYNAL, J. Une technique de préparation des grains de pollen fragiles. *Adansonia*, Paris, FR, v. 2, n. 11, p. 77–79, 1979.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, Boston, US, v. 17, p. 208–212, 1963.

8 DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL DE *Saccharum villosum* Steud

Resumo

A morfologia comparativa em embriões de monocotiledôneas é utilizada em estudos de desenvolvimento pós-seminal para fins taxonômicos e aqui foi focada em *Saccharum villosum* visando uma futura comparação com as outras espécies brasileiras desse gênero. As sementes contêm albumina em todas as espécies, com embrião diferenciado e lateral. A protrusão da plântula é sequencial, iniciando pela coleorriza, coleóptilo e plúmula. Algumas espécies vêm sendo consideradas sinônimos de *S. villosum*, e esse fato provoca conflito no momento da identificação da espécie. O gênero *Erianthus* está fortemente relacionado ao gênero *Saccharum*, portanto é essencial a descrição da morfologia pós-seminal como auxílio para a identificação de estruturas que possam servir de auxílio à taxonomia do gênero *Saccharum*. O desenvolvimento pós-seminal em *S. villosum* é análogo ao das outras espécies da família Poaceae com germinação considerada intermediária. O embrião é lateral e é considerado do tipo pequeno, essa característica sendo avaliada como ancestral em relação a Poaceae. Não houve identificação do epiblasto na espécie; assim sendo, não se encontraram características morfológicas que distinguíssem o gênero *Erianthus* de *Saccharum*.

Palavras-chave: Desenvolvimento pós-seminal; Morfologia comparativa; Embrião vegetal

Abstract

The morphological comparison of the embryo in monocots is used in post-seminal development studies for taxonomic purposes and here was centered on *Saccharum villosum* aiming at a future comparison with the other Brazilian species of this genus. The seeds of all species contain albumin, with a lateral and differentiated embryo. The protrusion of the seedling is sequential, starting with the coleorrhiza, coleoptile and plumule. Some species have been considered synonymous of *S. villosum*, and this fact causes conflict when the species must be identified. The genus *Erianthus* is closely related to the genus *Saccharum*; therefore, the post-seminal morphology is essential as an aid for the identification of structures that can serve as subsidy to the taxonomy of the genus *Saccharum*. The post-seminal development of *S. villosum* Steud is analogous to that of other species of the Poaceae with germination considered intermediate. The embryo is lateral and small, this characteristic being evaluated as ancestral in relation to the Poaceae. There was no identification of the epiblast in the species; therefore, no morphological characteristic was found that could distinguish *Erianthus* from *Saccharum*.

Keywords: Post-seminal development; comparative morphology; Plant embryo

8.1 Introdução

A comparação morfológica do embrião em monocotiledôneas é utilizada em estudos de desenvolvimento pós-seminal e é considerada essencial para a taxonomia das monocotiledôneas (EAMES, 1974). As análises do desenvolvimento pós-seminal são essenciais para esclarecer dúvidas relacionadas a padrões evolutivos e assim proporcionam uma filogenia mais robusta principalmente nas monocotiledôneas e na família Poaceae, que é uma família tão peculiar no que diz respeito ao desenvolvimento do embrião (NAKAMURA & SCATENA, 2009).

Nas gramíneas (Poaceae), a nomenclatura das estruturas emergentes do embrião em desenvolvimento é peculiar. O embrião encontrado dentro da semente ocupa posição lateral em relação ao endosperma. Essa característica é frequente e é considerada sinapomórfica para a família Poaceae (GPWG, 2001). A radícula é homóloga à coleorriza, o coleóptilo à lígula da folha cotiledonar (escutelo) e o epiblasto à bainha do cotilédone (COCUCCI & ASTEGIANO, 1978). A raiz primária nas gramíneas é reduzida, portanto a característica é considerada um caráter derivado em relação às outras famílias (BOYD, 1932; TILLICH, 2007).

Nakamura & Scatena (2009) realizaram um trabalho morfológico com o objetivo de encontrarem padrões de desenvolvimento na família Poaceae, comparando-a com espécies de monocotiledôneas previamente estudadas. Dentre as espécies estudadas, os autores encontram sementes albuminosas em todas as espécies, com embrião diferenciado e lateral. E concluíram que há homologias entre os representantes de Poaceae estudados e as monocotiledôneas previamente estudadas. Uma das relações é a protrusão sequencial da coleorriza, coleóptilo e plúmula. Porém, naqueles estudos não foram encontrados padrões em relação à emissão da primeira folha plumular. A emissão de catafilos (primeira folha com bainha alongada e limbo foliar reduzido) ocorreu apenas em uma espécie, a espécie considerada basal, *Olyra humilis*, portanto essa característica pode sugerir uma ancestralidade dentro do táxon. Mas a raiz primária reduzida, denominada coleorriza, é considerada um caráter derivado dentro de Poaceae.

Reeder (1957) realizou análises do desenvolvimento pós-seminal com o gênero *Erianthus*, o qual pertence ao complexo *Saccharum*. De forma geral, o autor analisou diversos gêneros da família Poaceae e listou quatro características que julgou importantes para a sistemática e para o agrupamento natural dos táxons: presença ou ausência de fenda no escutelo; presença ou ausência de epiblasto; vascularização e presença de folha plumular. Foi possível observar que nos embriões de *Erianthus* há presença de fenda no escutelo, vascularização e

folha plumular, mas houve ausência de epiblasto (excrescência da coleorriza, oposta ao escutelo). Essas características foram comuns para gêneros da tribo Andropogoneae, estudados pelo autor, dentre eles *Miscanthus*, que é, juntamente com *Erianthus*, outro gênero pertencente ao complexo *Saccharum*.

Algumas espécies vêm sendo consideradas sinônimas de *S. villosum*, provocando confusão no momento da identificação das espécies. Podem-se listar como exemplos *Erianthus balansae* Hack., *E. clandestinus* Swallen, *E. glabrinodes* (Hack.) Swallen, *E. purpureus* Swallen, algumas subvariedades de *E. saccharoides* Michx. e de *E. trinii*, *Saccharum balansae* (Hack.) Roberty, *S. giganteum* Trin. Ex Hack. e *S. trinii* (Hack.) Renvoize (FILGUEIRAS, 2003; WELKER & LONGHI-WAGNER, 2012). O gênero *Erianthus* está intimamente relacionado ao gênero *Saccharum*; assim é importante a classificação pós-seminal como auxílio para a identificação de estruturas basais ou derivadas e também para que não ocorra confusão na classificação da espécie *S. villosum* Steud.

No entanto, até o momento, não há relatos na literatura sobre o desenvolvimento e a formação de plântulas do gênero *Saccharum* para que assim seja possível auxiliar a sua sistemática e a identificação das espécies. O presente estudo visa auxiliar futuros estudos taxonômicos com a descrição do desenvolvimento pós-seminal como ferramenta.

8.2 Material e Métodos

O desenvolvimento pós-seminal de *S. villosum* Steud foi estudado a partir da germinação *in vitro* das sementes. Para a germinação, as sementes foram lavadas com água destilada e colocadas para germinar em placas de Petri com substrato de papel filtro à temperatura de 36°C e fotoperíodo de 12-8 horas de acordo com Giotto (2010) com modificações. As placas de Petri foram colocadas em câmara B.O.D. no Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP). Para facilitar as análises, as brácteas (pálea e lema) foram removidas das cariopses.

Foram consideradas embebidas as sementes cujas dimensões aumentaram e, germinadas, as sementes que apresentaram uma protuberância emergindo dos envoltórios após ter rompido os tegumentos e uma radícula de até 2mm. Os estádios de desenvolvimento das plântulas coletadas para a captura de imagens foram divididos em cinco fases: sementes não germinadas; protrusão da radícula pelo rompimento da testa; desenvolvimento da radícula e do coleóptilo; alongamento do mesocótilo, coleóptilo e radícula; aparecimento da primeira folha. Seis amostras para cada estágio foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965)

modificada [glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), CaCl_2 (0,001 M), tampão cacodilato de sódio (0,05 M), pH 7,2] (DE SOUZA, 2013).

Para as análises morfológicas externas, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de concentração de acetona a 35, 50, 70, 90 e 100% por 15 minutos cada e 2h e 30 minutos na acetona 70%. Em seguida, as amostras foram secas em HMDS (hexametildisilazano) e metalizadas em “stubs” (placas metálicas) com uma fina camada de ouro e observados em microscópio de varredura de pressão variável LEO 435 VP (MEV) (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Para as análises morfológicas, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (40-100%). Posteriormente, as amostras foram transferidas para propanol 100% por 8 horas e, em seguida, para butanol 100% *overnight*. A infiltração foi feita lentamente usando butanol:meio de infiltração (Leica, Heidelberg, Germany) (3:1, 1:1, 1:2), a 4°C e depois imersão em meio de infiltração por 10 dias. A polimerização foi realizada em meio de infiltração e endurecedor, conforme recomendação do fabricante, a temperatura ambiente por 48 horas.

As secções histológicas (5 μm) foram obtidas em micrótomo rotativo RM2155 Leica e contrastadas com solução de fucsina ácida 1% em água e azul de toluidina 0,05% (FEDER & O'BRIEN, 1968). As secções contrastadas foram montadas utilizando-se lamínula e entelan®. As amostras foram observadas ao microscópio óptico Leica LMD CTR 7000, sendo as imagens digitalizadas.

8.3 Resultados e Discussão

O desenvolvimento pós-seminal em *S. villosum*, como mostrado nas figuras 8.1 e 8.2, é semelhante ao de outras espécies da família Poaceae (MARTIN, 1946; NAKAMURA & SCATENA, 2009; EICHEMBERG, 2012).

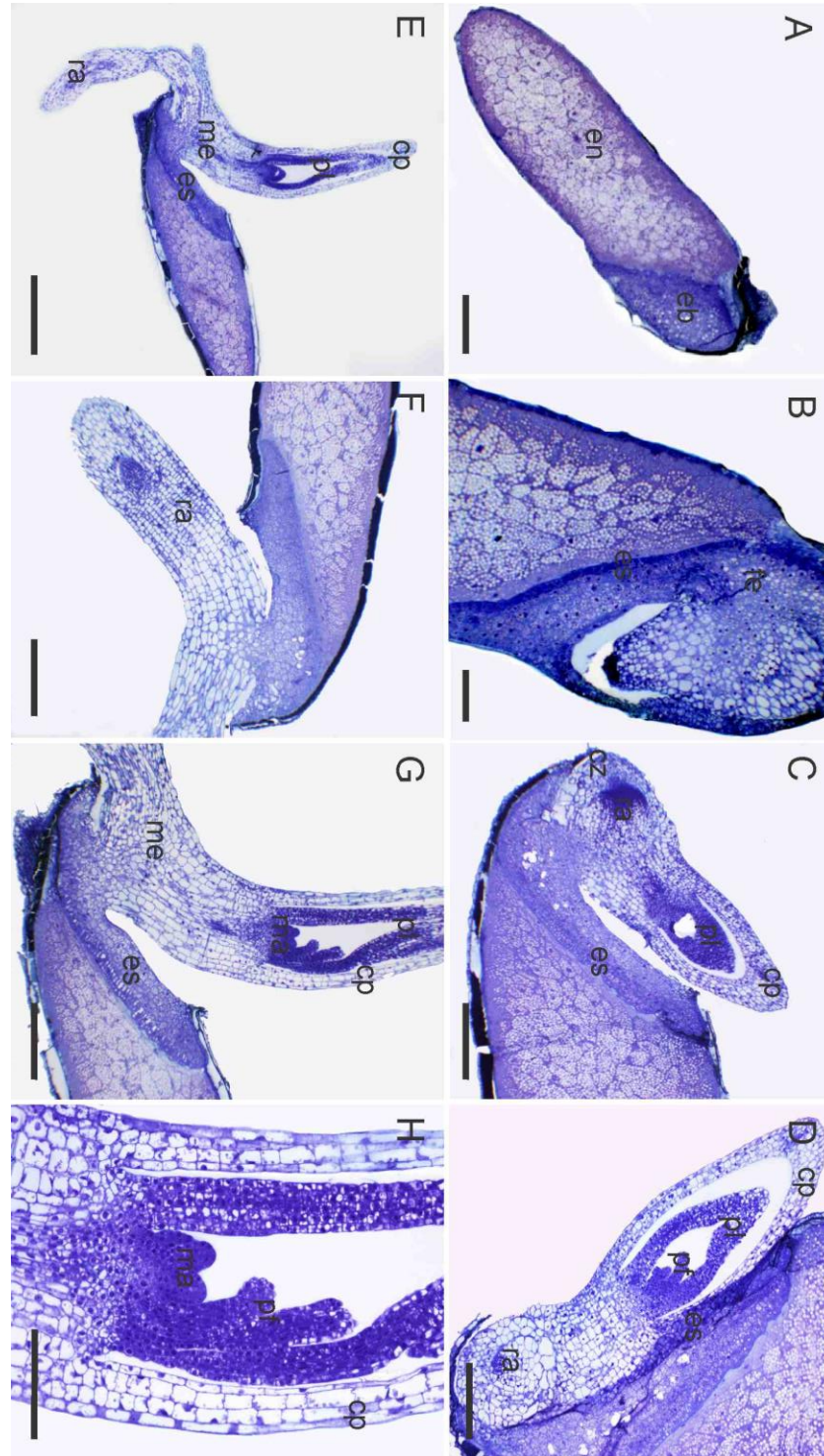


Figura 8.1 - Morfologia do desenvolvimento pós-seminal em *S. villosum* (Poaceae) em secção longitudinal por microscopia de luz- A) Vista geral da semente madura contendo endosperma (en) abundante; B) Detalhe do embrião, destacando-se o escutelo (es) e a fenda do escutelo (fe). C) Início do desenvolvimento do embrião com rompimento da testa (te); nota-se o aparecimento do escutelo (es). Após 48 horas de embebição, observa-se a emissão da coleoriza (cz) e do coleóptilo (cp) e o desenvolvimento da plúmula (pl); D) O embrião se alonga e surgem os primórdios foliares (pf); desenvolvimento da radícula (ra); E) Após 120 horas, observa-se o alongamento do mesocótilo, do coleóptilo e da radícula; F) Desenvolvimento da radícula; G) Desenvolvimento do meristema apical (ma) e o escutelo bem delimitado; G) Detalhe do desenvolvimento do meristema apical e primórdios foliares (pf). Barras: A,C,D,F,G= 300 μ m; E= 600 μ m; B,H= 150 μ m

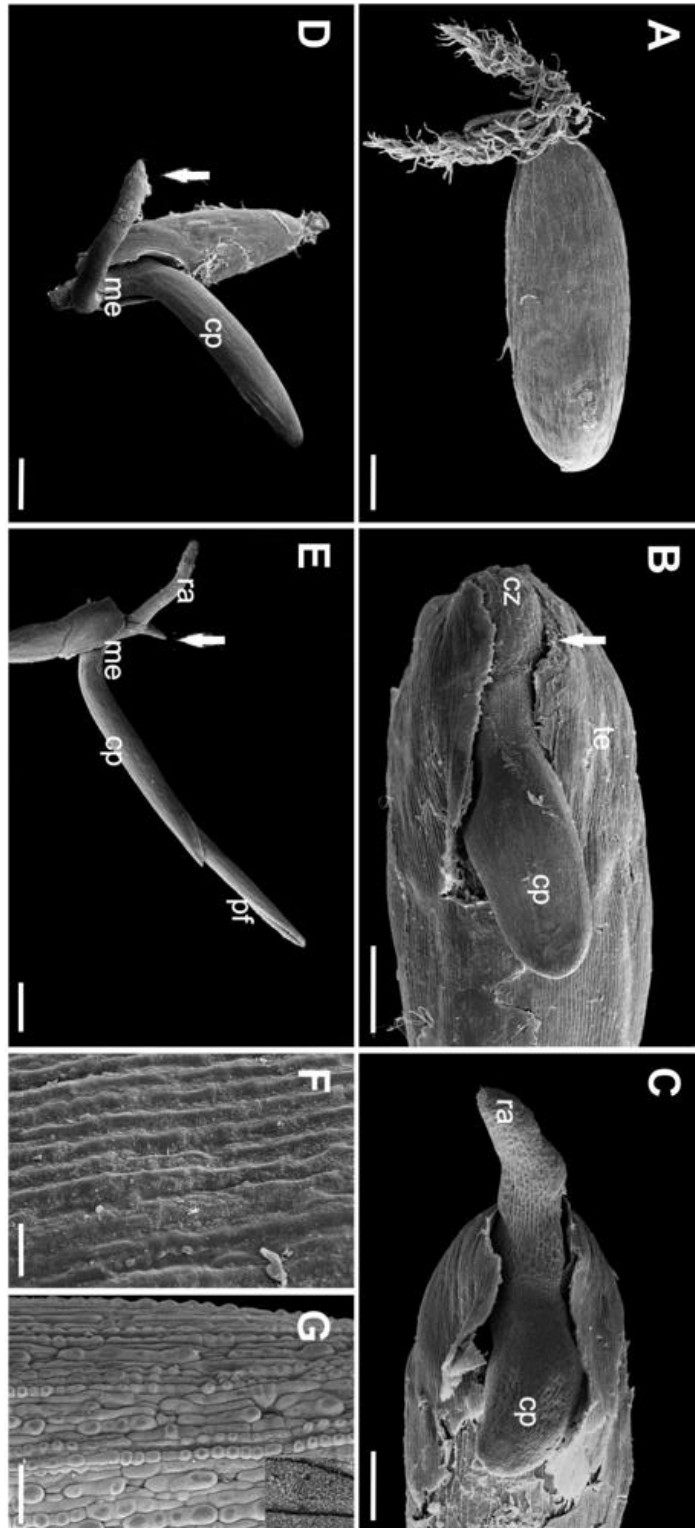


Figura 8.2 - Morfologia do desenvolvimento pós-seminal em *S. villosum* (Poaceae)- MEV- A) Vista geral da semente madura; B) Rompimento da testa (te) e emissão da coleoriza (cz) e coleóptilo (cp) após 48 horas de embebição. Primórdios do mesocótilo (seta); C) Após 72 horas, observa-se o desenvolvimento da radícula; D) Após 120 horas, o desenvolvimento da radícula e predominância da coleoriza (Seta) são evidentes. Há o alongamento do mesocótilo (me) e do coleóptilo (cp); E) Após cerca de 168 horas, ocorre o alongamento do coleóptilo, o aparecimento da primeira raiz adventícia na radícula (Seta) e a emissão da primeira folha (pf). F) Detalhe da superfície da semente; G) Detalhe da superfície da folha com grande quantidade de cera epicuticular (detalhe). Barras: A,C-D=400; B=200 μm ; E= 600 μm ; F-G=900 μm

As sementes são tipicamente albuminosas (GPWG 2001; WERKER, 1997) com embrião lateral em relação ao endosperma (Figura 8.1 A). Essa característica é considerada uma sinapomorfia da família Poaceae (GPWG, 2001).

As sementes são tipicamente albuminosas (GPWG 2001; WERKER, 1997) com o embrião lateral que ocupa cerca de um quinto da semente (Figura 8.1 A). De acordo com Martin (1946) a classificação do embrião é do tipo pequeno, pois tem menos de um quarto de tamanho em relação à semente. Essa característica morfológica pode ser encontrada na espécie *Axonopus aureus* (Poaceae) e em espécies do gênero *Paspalum* (Panicoideae) (EICHEMBERG, 2012; NAKAMURA & SCATENA, 2009). A proporção do embrião em relação ao seu endosperma é considerada uma característica divergente evolutivamente (REEDER 1957). Quanto menor o embrião em relação à quantidade de endosperma, mais basal é a espécie em determinado táxon (GUNN, 1981; NAKAMURA & SCATENA, 2009).

O desenvolvimento pós-seminal relatado em cana-de-açúcar (*Saccharum x officinarum*) é semelhante ao encontrado em *S. villosum*, com exceção do tamanho do embrião. Segundo Moore (1987), o embrião da cana-de-açúcar é grande em relação à quantidade de endosperma, o que indica segundo Gunn (1981) que a cana-de-açúcar apresenta uma característica derivada em relação à quantidade de endosperma presente em *S. villosum*.

Após o rompimento da testa do tegumento (te) (Figura 8.1 C, E), a coleorriza (cz) e o coleóptilo (cp) emergem, 48 horas depois da embebição (Figura 8.1 B). No interior do coleóptilo está presente a plúmula (pl) (Figura 8.1 C, D) e o meristema apical (ma) (Figura 8.1 G, H).

A germinação de *S. villosum* não é considerada lenta ou rápida se comparada com outras espécies da família Poaceae. Nakamura & Scatena (2009) observaram em espécies de Poaceae uma germinação de no máximo 16 horas (*Chloris elata* - Chloridoideae) após a embebição e a mais demorada, cerca de oito semanas *Olyra humilis* - Bambusoideae).

O escutelo (es) se torna evidente logo após o aparecimento da coleorriza e do coleóptilo (Figura 8.1 E). Há várias interpretações para o que o escutelo representa no desenvolvimento do embrião. Alguns afirmam que o escutelo é parte do cotilédone do embrião (BOYD, 1931), ou folha modificada do embrião (COCUCCI & ASTEGIANO, 1978). Outros interpretam que o escutelo e o coleóptilo são folhas embrionárias, juntamente com o epiblasto (NEGBI & KOLLER, 1962). Segundo Tillich (2007), o escutelo é conhecido como hiperfilo e é considerado parte distal do cotilédone do embrião, com função de absorver os nutrientes do endosperma. O coleóptilo seria a parte inferior do cotilédone sendo chamado de hipofilo. Em *S. villosum*, é observada a presença da fenda do escutelo (Figura 8.1 B), assim como encontrado

em várias espécies de Poaceae (NAKAMURA & SCATENA, 2009) como também em espécies de *Erianthus* (REEDER, 1957).

A presença de epiblasto é considerada uma estrutura embrionária de caráter basal exclusiva da família Poaceae (GPWG, 2001). Boyd (1931) considera o epiblasto a segunda folha plumular, porém Negbi & Koller (1962) consideram que o epiblasto é uma folha embrionária. Na espécie *S. villosum*, não foi observada a presença dessa estrutura, assim como também não foi observada em espécies do gênero *Paspalum* (NAKAMURA & SCATENA, 2009; EICHEMBERG, 2012). No gênero *Erianthus*, Reeder (1957) não encontrou epiblasto nas estruturas do embrião. Essa característica é comum para gêneros da tribo Andropogoneae, estudados pelo autor, dentre eles *Miscanthus*, que é, juntamente com *Erianthus*, outro gênero pertencente ao complexo *Saccharum*.

Alguns autores acreditam que o epiblasto seria uma excrescência da coleorriza (TILLICH 1995; 2000). Em *S. villosum*, a raiz adventícia surge da mesma região em que estaria o epiblasto, ou seja, do lado oposto ao escutelo no embrião (Figura 8.1 F,G). Contrapondo Negbi & Koller (1962) que discordaram demonstrando evidências de que epiblasto, escutelo e coleóptilo são as três primeiras folhas embrionárias.

Através das primeiras diferenciações, é possível perceber que a raiz de *S. villosum* é de origem endógena (Figura 8.1 C) como também pode ser observado na maioria das espécies de Poaceae. A raiz endógena é envolvida pela coleorriza, sendo esta uma estrutura não vascularizada, preenchida pelo meristema fundamental com epiderme tricomatosa. A coleorriza é considerada uma redução da raiz primária ou homóloga à radícula (NEGBI & KOLLER, 1962; COCUCCI & ASTEGIANO, 1978; DAHLGREN *et al.*, 1985; NAKAMURA & SCATENA, 2009).

Interiormente ao coleóptilo, há a plúmula e o meristema apical caulinar (Figura 8.1 F). Após 72 horas do início da embebição, ocorre o alongamento do mesocótilo (Figura 8.2 E) e a partir disso, há a formação da raiz adventícia (ra) (Figura 8.2 G). A primeira folha inicia o processo de diferenciação a partir da plúmula (Figura 8.1 F). Após 120 horas, com o alongamento da radícula, é possível observar a presença da coleorriza predominante, caracterizada por ser uma região meristemática com pólo radicular com presença de pelos radiculares (Figura 8.2 G). Características semelhantes são encontradas em embriões de cana-de-açúcar (RAE *et al.*, 2014).

No quadro F da figura 8.2 é possível observar a emissão da primeira folha a partir da plúmula e do alongamento do mesocótilo e do coleóptilo e, concomitantemente, da radícula (rd) (NEGBI & KOLLER, 1962), e o surgimento da raiz adventícia (Figura 8.1 G e Figura 8.2 E).

O desenvolvimento da primeira raiz adventícia ocorre entre 72 e 120 horas após o início da embebição. Essa característica é semelhante ao que ocorre com as espécies estudadas por Nakamura & Scatena (2009) com espécies de Poaceae.

Após 168h do início da embebição das sementes de *S. villosum*, as plântulas já estão desenvolvidas, com folhas lineares e paralelinérveas (Figura 8.2 E) com epiderme abundante em cera epicuticular (Figura 8.2 G). Durante toda a observação, a cariopse permaneceu aderida à plântula.

8.4 Conclusão

O desenvolvimento pós-seminal em *Saccharum villosum* é semelhante às outras espécies da família Poaceae. O embrião é lateral e ocupa cerca de um quinto da semente, sendo considerado um embrião do tipo pequeno com essa característica sendo considerada ancestral.

A germinação é considerada intermediária. Não houve observação da presença de epiblasto na espécie assim como encontrada no gênero *Erianthus*. Não foram encontradas características que distinguem *Erianthus* de *Saccharum* com o presente estudo. Porém houve características que permitiram determinar a ancestralidade de *S. villosum* em relação às espécies de *Saccharum* cultivadas.

Este trabalho dará subsídios para futuros estudos taxonômicos mais amplos com o gênero *Saccharum* sp, utilizando o desenvolvimento pós-seminal como ferramenta.

Referências

BOYD, L. Evolution in the monocotyledonous seedling: a new interpretation of the morphology of the grass embryo. **Transaction and Proceedings/Botanical Society of Edinburgh**, Edimburgh, UK, v.30, n. 4, p. 286-303, 1931.

_____. Monocotylous seedling: morphological studies in the post-seminal development of the embryo. **Transaction and Proceedings/Botanical Society of Edinburgh**, Edimburgh, UK, v. 31, p. 1-224, 1932.

COCUCCI, A. E.; ASTEGIANO, M. E. Interpretacion del embrion de las Poáceas. **Kurtziana**, Córdoba, AR, v. 11, p. 41-54, 1978.

DALHGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy**. Berlin: Springer-Verlag, 1985. 520p.

DE SOUZA, E. H. **Reprodução e hibridação interespecífica e intergenérica em bromeliáceas com potencial ornamental**. 2013. 256 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2013.

EAMES, A. J. **Morphology of the angiosperms**. New Delhi, IN: Tata McGraw-Hill, 1974. 548p.

EICHEMBERG, M. T. **Morfologia e anatomia de *Paspalum L.* (Poaceae, Poales) e suas implicações taxonômicas**. 2012. 103p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2012.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, New York, NY, v. 55, p. 123-142, 1968.

FILGUEIRAS, T. S. *Saccharum L.* In: ZULOAGA, F.O.; MORRONE, O.; DAVIDSE, G.; FILGUEIRAS, T.S.; PETERSON, P.M.; SORENG, R.J.; JUDZIEWICZ, E.J. **Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae and Danthoioideae**. Washington, DC: National Museum of natural history, 2003. p. 550-557.

GIOTTO, A. C. **Avaliação do desenvolvimento dos componentes arbóreos e herbáceos na recuperação de áreas degradadas na bacia do Ribeirão do Gama**. 2010. 101p. Mestrado (Dissertação Ciências Florestais), Faculdade de tecnologia da Universidade de Brasília, Departamento de engenharia florestal, Brasília, DF, 2010.

GPWG - Grass Phylogeny Working Group. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, MO, v. 88, n. 3, p. 373-457, 2001.

GUNN, C. R. Seeds of Leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Orgs.). **Advances in legume systematics**. Kew, UK: Crow copyright, 1981. p. 913-925.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, NY, v. 27, p. 137-138, 1965.

MARTIN, A. C. The comparative internal morphology of seeds. **The American Midland Naturalist**, Notre Dame, US, v. 36, p. 513-660, 1946.

MOORE, P. H. Anatomy and morphology. In: HEINZ, D. J. (Org.) **Sugarcane Improvement Through Breeding**, Amsterdam, NE: Elsevier, 1987. p. 85-142.

NAKAMURA, A.T. & SCATENA, V.L. Desenvolvimento pós-seminal de espécies de Poaceae (Poales). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, MG, v. 23, n. 1, p. 212-222, 2009.

NEGBI, M.; KOLLER, D. Homologies in the grass embryo – a re-evaluation. **Phytomorphology**, Amsternam, NE, v.12, p. 289-296, 1962.

RAE, A. L.; MARTINELLI, A. P.; DORNELAS, M. C. Anatomy and Morphology. In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Orgs.). **Sugarcane: Physiology, Biochemistry & Functional Biology**. New Jersey, US: John Wiley & Sons, 2014. p. 19-33.

REEDER, J. R. The embryo in grass systematics. **American Journal of Botany**, New York, NY, v.44, p.756-768, 1957.

TILLICH, H. J. Seedlings and systematics in monocotyledons. In: RUDALL, P. J.; CRIBB, P. J.; CUTLER, D. F.; HUMPHRIES, C. J. (Orgs.). **Monocotyledons: systematics and evolution**. Kew, UK, Royal Botanic Gardens, 1995. p. 303-352.

_____. Ancestral and derived character states in seedlings of monocotyledons. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D.A. (Orgs.). **Monocotyledons: Systematics and evolution**. Melbourne, AU: CSIRO, 2000. p. 221-228.

_____. Seedling diversity and homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). **Annals of Botany**, Oxford, v.100, p. 1-17, 2007.

WELKER, C. A. D.; LONGHI-WAGNER, H. M. The genera *Eriochrysis* P. Beauv., *Imperata* Cirillo and *Saccharum* L. (Poaceae - Andropogoneae - Saccharinae) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal Botany**, Porto Alegre, v. 35, n.1, p. 87-105, 2012.

WERKER, E. **Seed anatomy**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1997. 400p.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, este trabalho auxilia na compreensão do comportamento reprodutivo da espécie *Saccharum villosum* concluindo que, na espécie, pode haver comportamento misto (comportamento alógamo e autógamo).

A autogamia na espécie pode ser considerada garantida, pois é vista formação de sementes sem a viabilidade de fluxo gênico com outras espécies de plantas da espécie. Porém, a alogamia deve ser pesquisada mais a fundo, já que consideramos o comportamento alógamo como uma possibilidade na espécie. Necessita-se compreender que entre o período 2014/2015 o fator climático foi atípico na região de pesquisa, no que diz respeito ao período e a quantidade de chuvas e, conseqüentemente, à umidade do solo e do ar, de forma que a região sofreu com uma seca noticiada como a pior dos últimos 20 anos. Com a seca, o comportamento da espécie pode alterar, visando proteger a própria prole das variações climáticas. Um dos possíveis sinais no comprometimento reprodutivo ocasionado pela seca foi a observação de sementes malformadas precisamente durante a crise de seca na região. Devido a esses dados, os quais podem ter influenciado no comportamento reprodutivo da espécie como um todo, é necessário avaliar anos posteriores para que sejam avaliados com maior precisão um padrão de comportamento específico do táxon.

Levando em consideração a morfologia e as dimensões do pólen de *S. villosum* com o restante das espécies de *Saccharum* encontradas por Chaturvedi & Datta (2001) e devida à alta viabilidade encontrada na região e *S. villosum* à provavelmente grandes chances de ocorrer o fluxo gênico no sentido de haver risco do pólen selvagem contaminar cultivares de cana-de-açúcar e produzir híbridos com escape de transgene para o meio ambiente.

Como avaliado também, a viabilidade dos grãos de pólen em cultivares de cana-de-açúcar e as características florais de específicas cultivares fornecem possibilidade de escape gênico na região centro-sul, em que a possibilidade foi desacreditada devida a crença de incapacidade de formação de sementes de cana-de-açúcar na região, o que não correspondem aos resultados encontrados.

O auxílio à taxonomia com experimentos de desenvolvimento pós-seminal visando a facilidade em identificação à partir de características embrionárias específicas não foi possível ser alcançada. Não há muitos estudos com o gênero *Saccharum* no assunto, portanto esse trabalho pode ser subsídio para outras pesquisas com espécies do gênero e também poderá ser utilizada para representar o gênero em características diagnósticas pós-seminalis.