

**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. Á 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.....	17
2 OBJETIVO.....	18
2.1 Objetivos específicos	18
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.....	33
Referências.....	35
5 FENOLOGIA E COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE <i>Saccharum villosum</i> Steud.	42
Resumo	42
Abstract.....	42
5.1 Introdução	43
5.2 Material e Métodos.....	44
5.2.1 Monitoramento do florescimento em campo	44
5.2.2 Monitoramento do comportamento <i>ex situ</i>	44
5.2.2.1 Análises de sementes malformadas	45
5.2.3 Análises de formação de embrião.....	45
5.3 Resultados e Discussão	46
5.4 Conclusão.....	46

Referências.....	46
6 SEXAGEM DE HÍBRIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR E VIABILIDADE POLÍNICA DE <i>Saccharum</i> sp. PROVENIENTES DA REGIÃO CENTRO-SUL DO BRASIL	49
Resumo	49
Abstract.....	49
6.1 Introdução	49
6.2 Material e Métodos.....	49
6.2.1 Materiais.....	49
6.2.2 Métodos.....	49
6.2.2.1 Sexagem de híbridos de cana-de-açúcar	49
6.2.2.2 Viabilidade polínica de <i>Saccharum</i> sp.....	49
6.3 Resultados e Discussão	49
6.4 Conclusão.....	49
Referências.....	49
7 MORFOLOGIA POLÍNICA DE <i>Saccharum villosum</i> Steud	50
Resumo	50
Abstract.....	51
7.1 Introdução	51
7.2 Material e Métodos.....	52
7.3 Resultados e Discussão	53
6.4 Conclusão.....	58
Referências.....	58
8 DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL DE <i>Saccharum villosum</i> Steud.....	62
Resumo	62
Abstract.....	62
8.1 Introdução	63
8.2 Material e Métodos.....	64
8.3 Resultados e Discussão	65
8.4 Conclusão.....	70
Referências.....	70
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74

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. 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. Assim como, informações sobre a morfologia pós-seminal da espécies *S. villosum*, com o objetivo de auxiliar na taxonomia do grupo. Além disso, as características morfológicas dos grãos de pólen de *S. villosum* correspondem às do gênero *Saccharum*. 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.

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. 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. As well as information on post-seminal morphology of the species *S. villosum*, in order to assist the group's taxonomy. Furthermore, the morphological characteristics of the pollen grains *S. villosum* correspond to the genus *Saccharum*. 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.

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).

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_portugues_12_2012.pdf. 2012. Acesso em: 15 jan.2015.

2 OBJETIVO

Este trabalho visa gerar subsídios para avaliação 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

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*.

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).

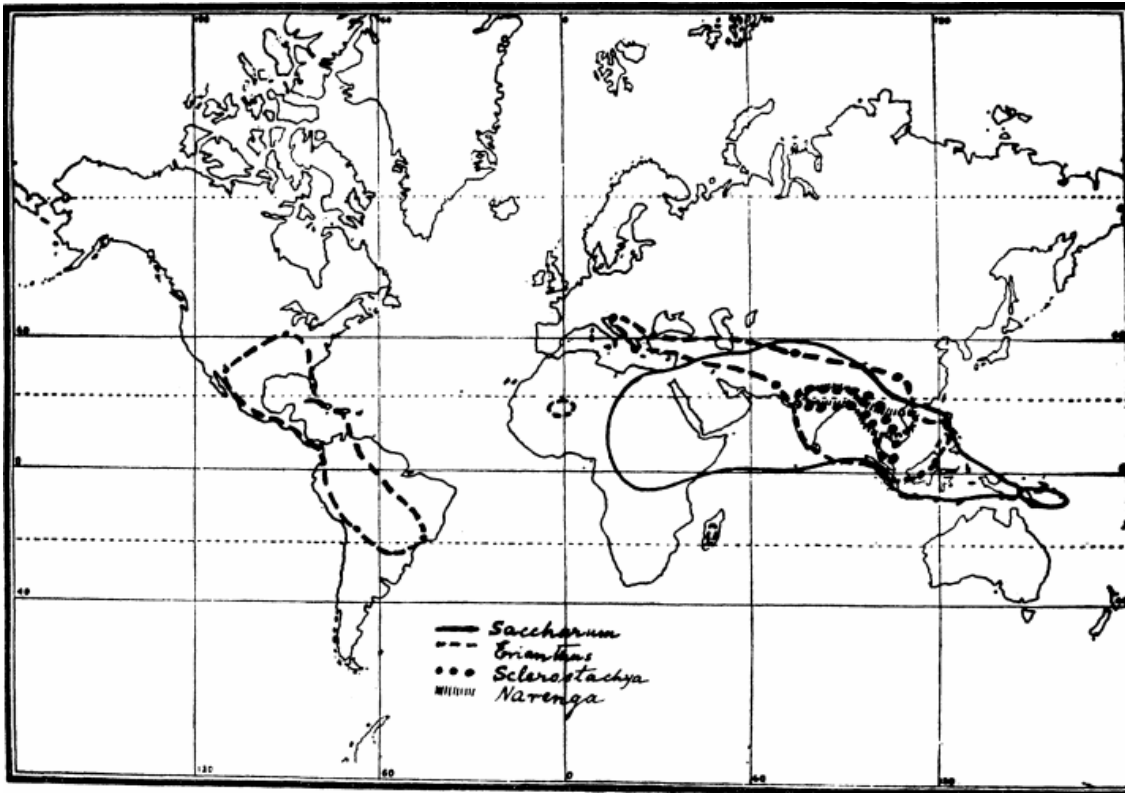


Figura 4.1 - Mapa mostrando a distribuição geográfica de quatro gêneros da subtribo Saccharinae (*Saccharum*, *Erianthus*, *Sclerostachya* e *Narenga*). **Fonte:** Mukherjee (1957)

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.

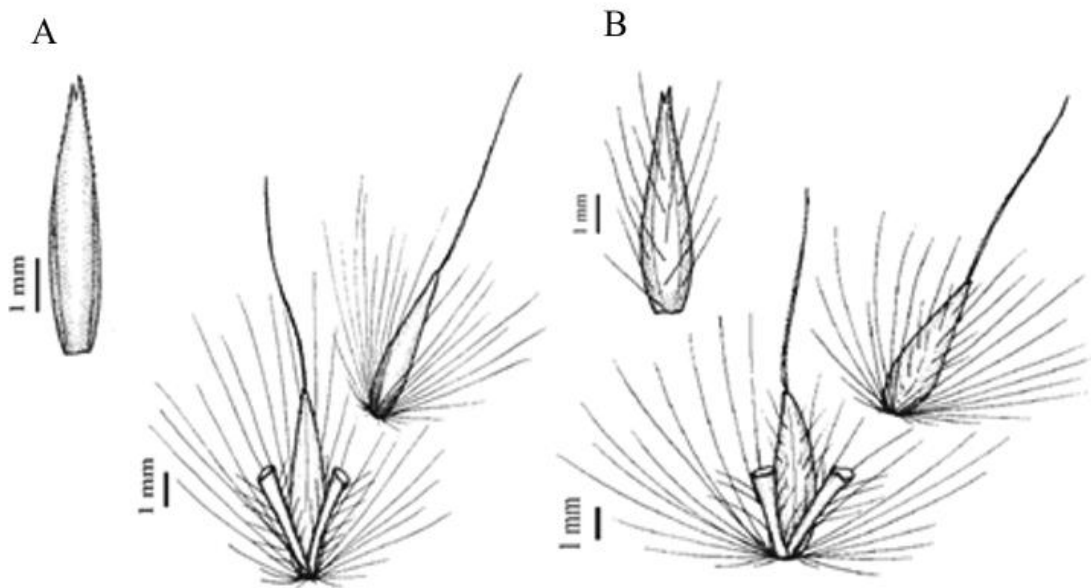


Figura 4.2 - A) Representação da espiguetta sésseis de *Saccharum asperum* (Nees) Steud (Longhi-Wagner & Welker 10811) e a gluma inferior com ausência de tricomas. B) Representação da espiguetta sésseis de *S. villosum* e *S. angustifolium* com presença de tricomas na gluma inferior. **Fonte:** WELKER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

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).

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 homogeneamente, 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 (CHARTURVEDI & 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. Entre as características de importância relativas ao pólen, estão aquelas acerca da viabilidade polínica.

4.4 Estudos morfológicos

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.

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.

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 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).

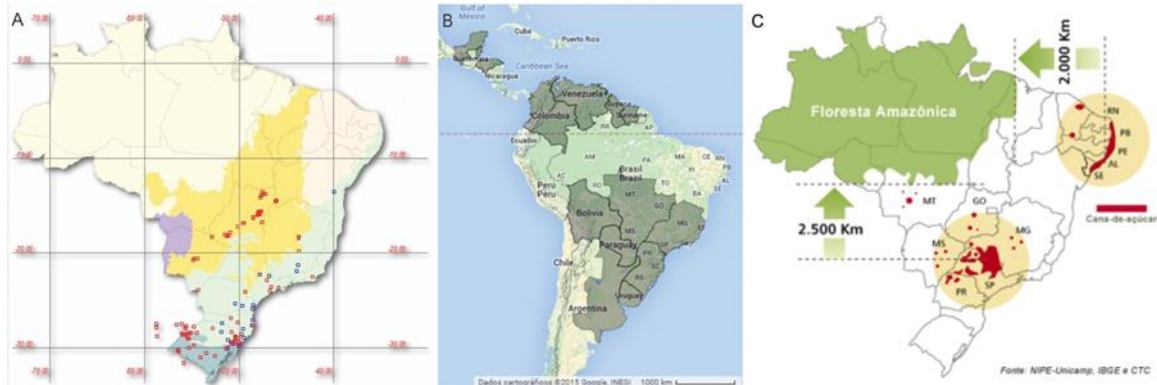


Figura 4.3 – Distribuição da espécie *S. villosum* no Brasil e no mundo. A) Distribuição da espécie *S. villosum* no território brasileiro emitida pela rede SpeciesLink (<http://www.splink.org.br/>) (CRIA, 2002). Os pontos vermelhos e azuis correspondem às coordenadas geográficas dos pontos de coleta 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).

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 sand 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-Fintergenic 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 cognitae, 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 *Etlingera 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.; 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.

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**, Canberra, 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*). 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). 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.

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. 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). 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.

Keywords: Reproductive behavior; *Saccharum villosum*; Phenological 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.

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.

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 localiza-se na rodovia Índio Tibiriça (SP-31) (23° 68' 55.48" S e 46° 37' 26.62") e a outra localiza-se 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 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

5.3 Resultados e Discussão

5.4 Conclusão

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.

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. 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*.

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. 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*.

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.

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 cocadilato 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

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 μm) (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

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

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)**

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.

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).

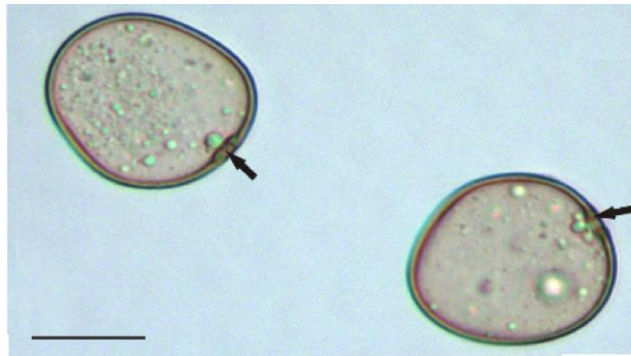


Figura 7.1 - Grãos de pólen tratados por meio de acetólise láctica (ACLAC 40). Em destaque, evidenciam-se os poros por onde é liberado o conteúdo celular (Setas). Barra: 25 μ m

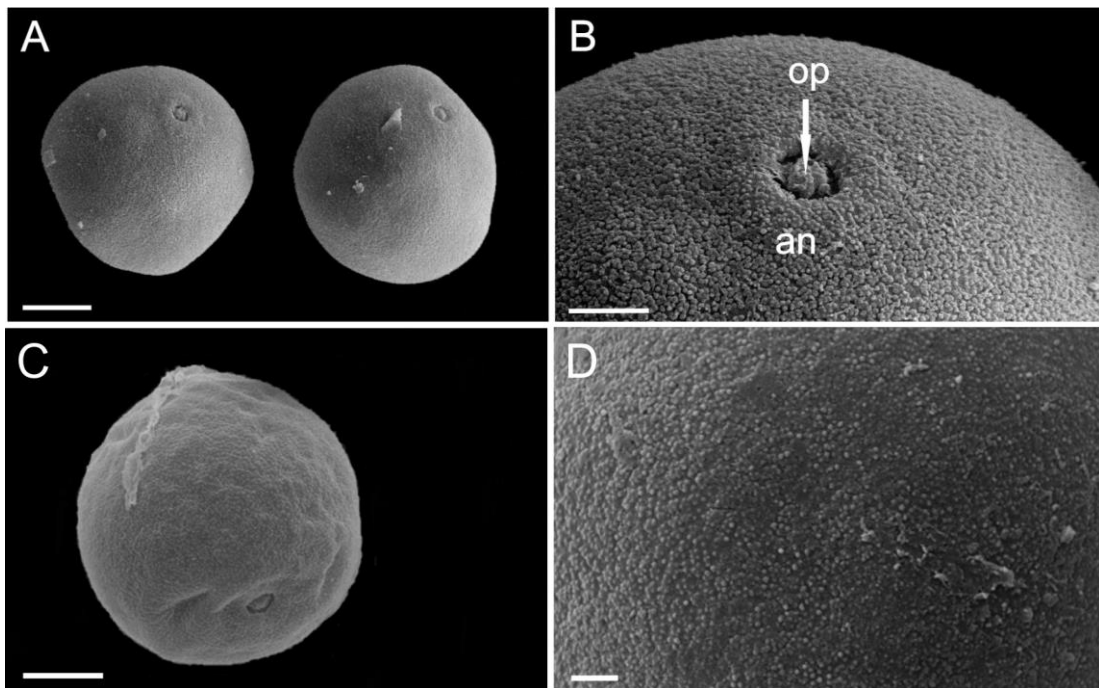


Figura 7.2 - Morfologia do pólen de *S. villosum* obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A) Pólenes de *S. villosum* em antese. B) Vista do poro do pólen, destacando o opérculo (Seta) e o ânulo. C) Vista do pólen de *S villosum* em maior aumento. D) Ornamentação da exina do pólen de *S.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

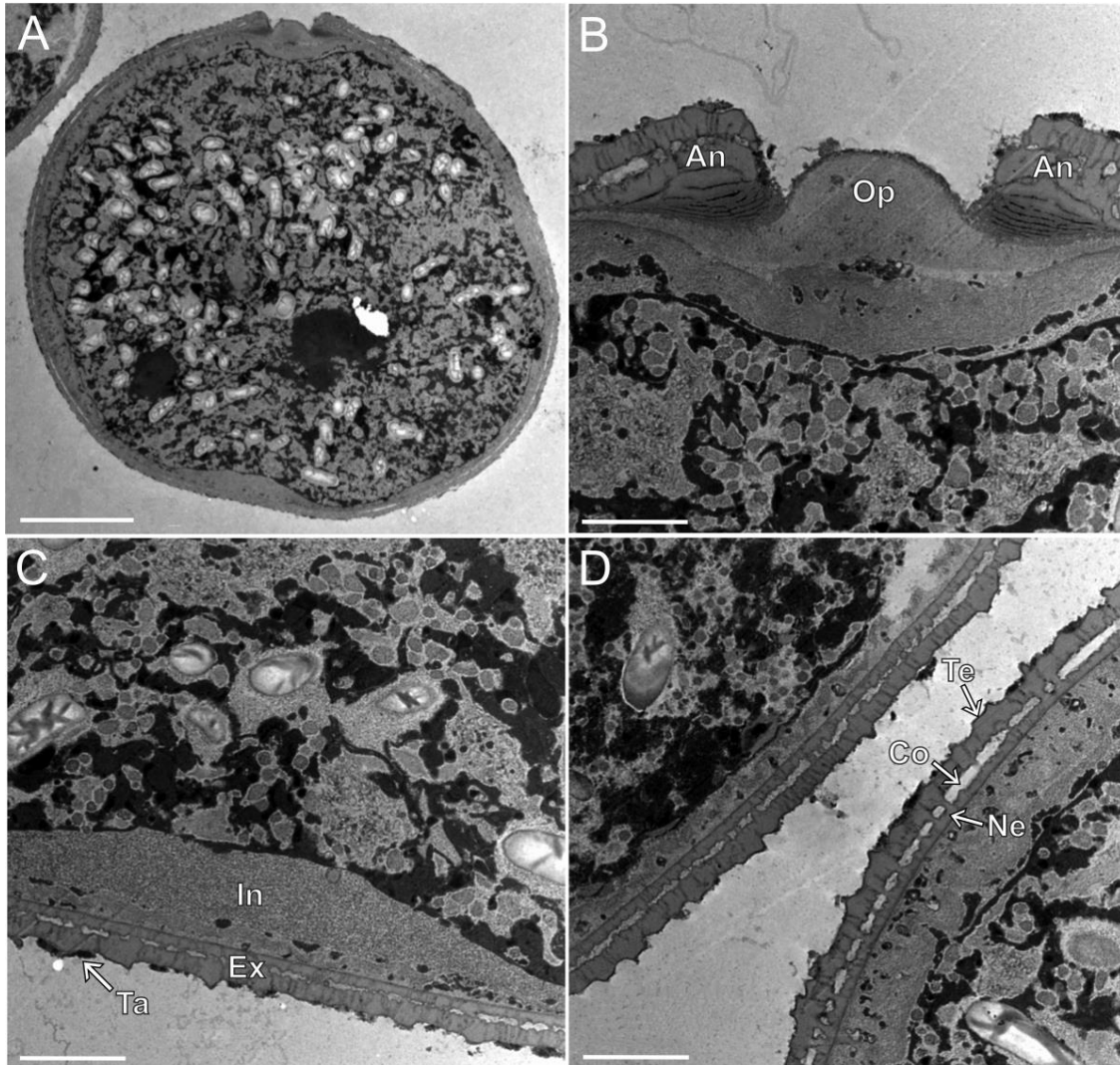


Figura 7.3 - Morfologia do pólen de *S. villosum* obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A) Corte dos grãos de pólen de *S. villosum* em antese. B) Destaque do poro do pólen de *S. villosum* Steud. An: ânulo; Op: opérculo. C) Destaque da parede do pólen de *S. villosum* Steud. Ex: exina;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

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 μm , com média de 0,811 $\mu\text{m} \pm 0,15$ (Figura 7.3 D; Figura 7.4 A e Tabela 7.1).

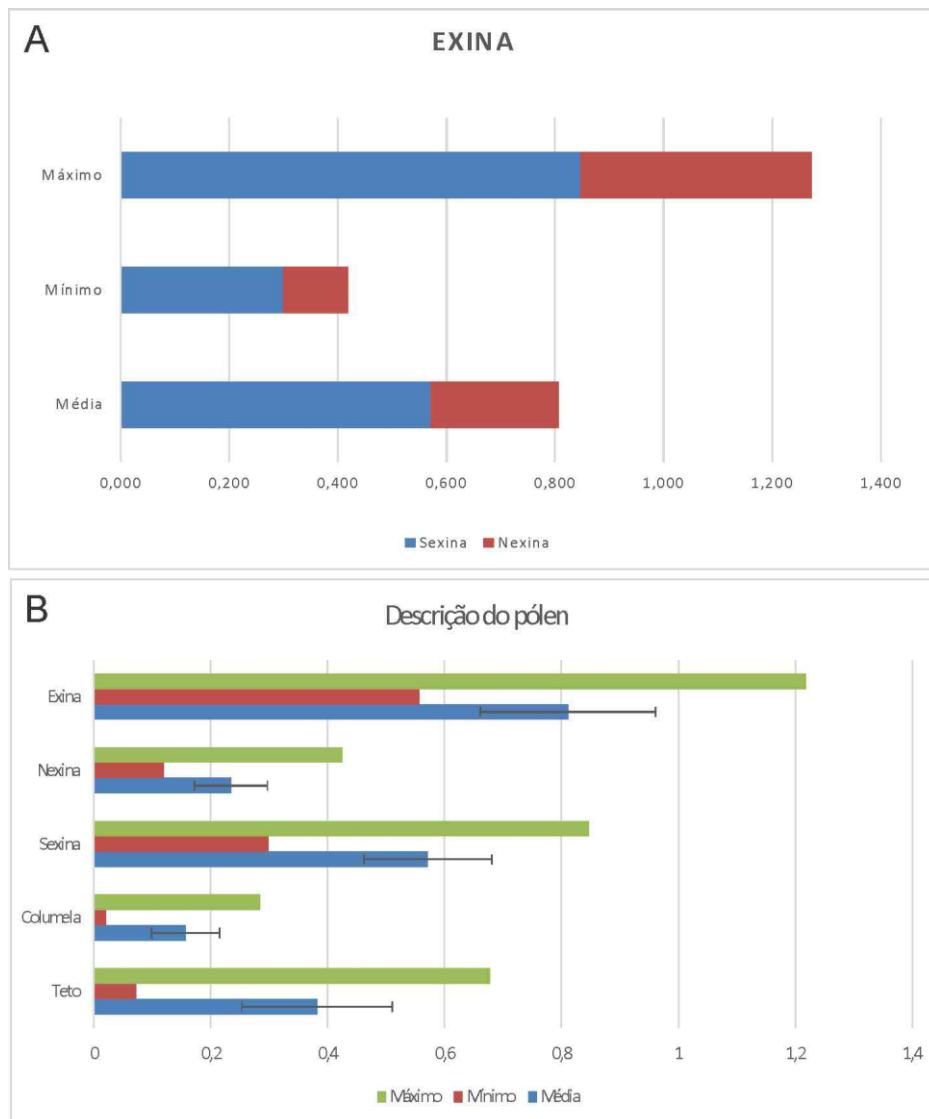


Figura 7.4 - A) Gráfico ilustrando a medida máxima, mínima e a média encontrada dentre as sexinas e nexinas medidas em todas as repetições. B) Descrição geral das estruturas do pólen de *S. villosum* destacando as medidas máximas, mínimas e a média encontrada nas cinco estruturas medidas

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 $0,847 \mu\text{m}$ (Tabela 7.1; Figura 7.4 B) e a nexina variou de 0,12 a $0,425 \mu\text{m}$ 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 $0,677 \mu\text{m}$ 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 $0,285 \mu\text{m}$ (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*.

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%), CaCl₂ (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 (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-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).

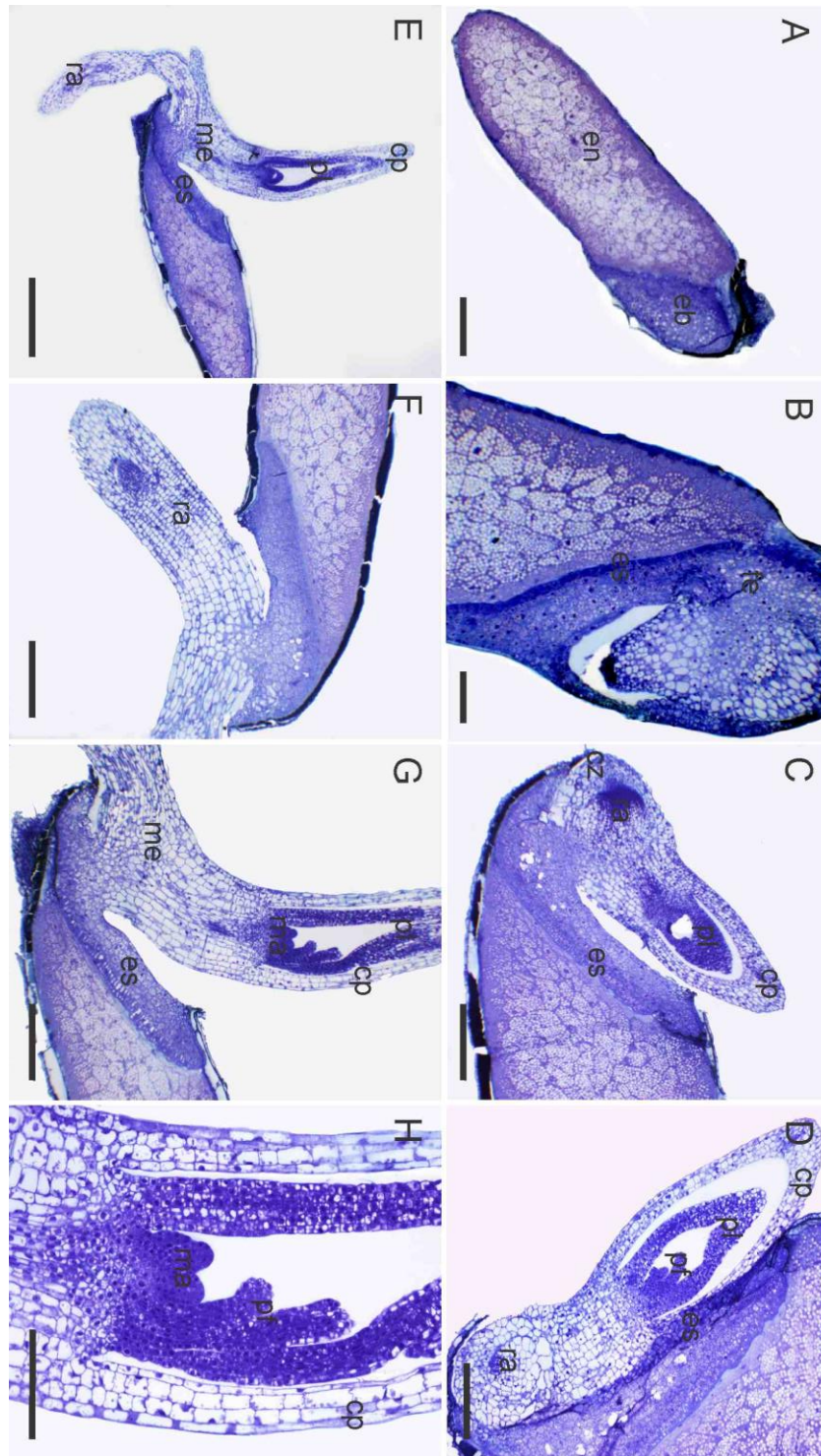


Figura 8.1 - Morfologia do desenvolvimento pós-seminal em *S. villosum* (Poaceae) em secção longitudinal por microscopia de luz- A) Vista geral da semente madura contendo endosperma (en) abundante; B) Detalhe do embrião, destacando-se o escutelo (es) e a fenda do escutelo (fe). C) Início do desenvolvimento 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

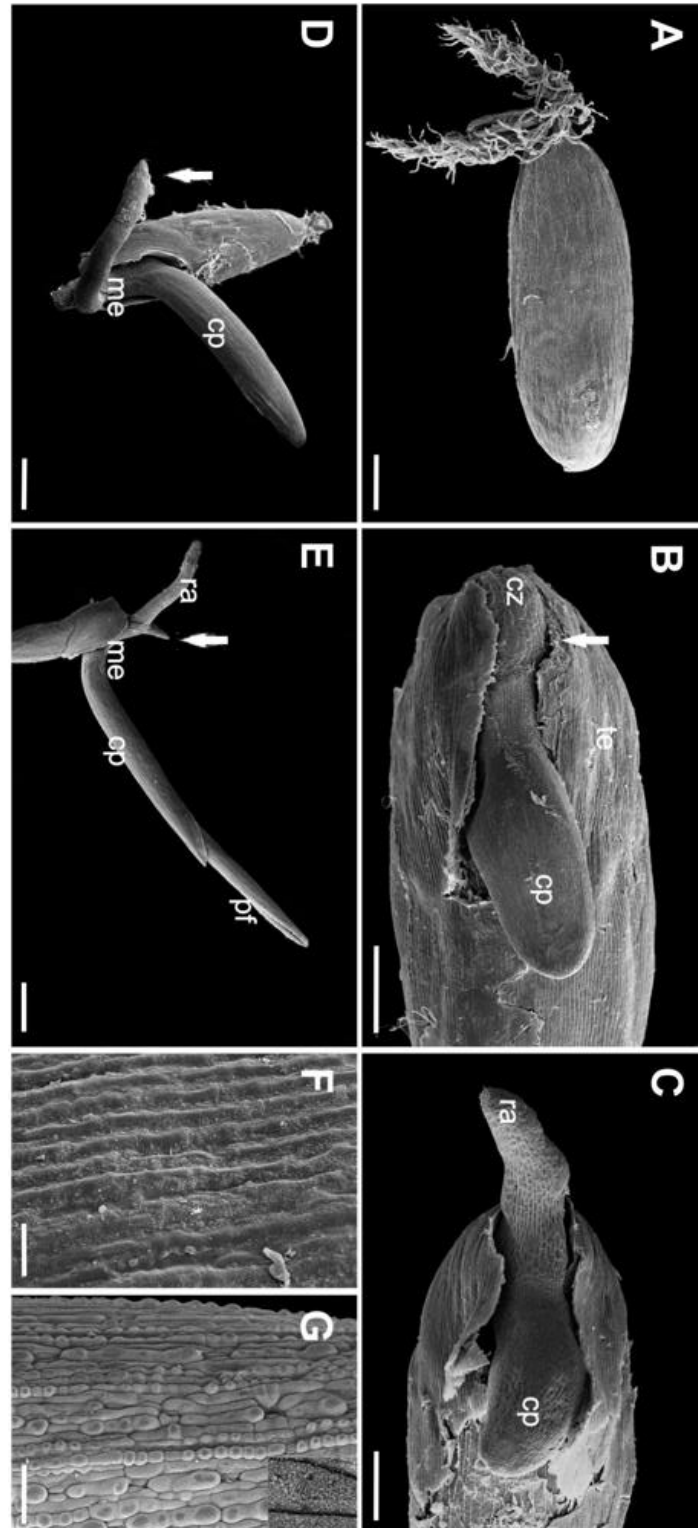


Figura 8.2 - Morfologia do desenvolvimento pós-seminal em *S. villosum* (Poaceae)- MEV- A) Vista geral da semente madura; B) Rompimento da testa (te) e emissão da coleorriza (cz) e coleóptilo (cp) após 48 horas de embebição. Primórdios do mesocótilo (seta); C) Após 72 horas, observa-se o desenvolvimento da radícula; D) Após 120 horas, o desenvolvimento da radícula e predominância da coleorriza (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 μ m; E= 600 μ m; F-G=900 μ m

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 Danthonioideae**. 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

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-seminais.