

## Proposta para bolsa PIBIC – CNPEM

Pesquisadora: Dra. Lucia Mattiello – PPB - CTBE

### Estudo anatômico de diferentes segmentos da folha +1 de cana-de-açúcar

#### Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) possui metabolismo fotossintético  $C_4$ , sendo caracterizada, principalmente, por sua capacidade de acumular altas concentrações de sacarose (em torno de 0,7 M) em seus colmos maduros (Moore, 1995), tornando-a uma das mais importantes plantas cultiváveis do planeta para a produção de bioetanol. O interesse mundial pelo bioetanol e por variedades de cana-de-açúcar com maior teor de sacarose está em franco aumento.

Devido a isso, grande parte dos estudos focalizou primariamente o crescimento vegetativo dos colmos de cana-de-açúcar durante a maturação dos entrenós acumuladores de sacarose (Lima et al., 2001; Carson et al., 2002; Casu et al., 2003; Casu et al., 2004; Casu et al., 2007). Contudo, estudos que visam o mesmo nível de informação para o desenvolvimento da folha, consideradas excelentes ferramentas de estudo para o estabelecimento da função fotossintética, são inexistentes e o conhecimento do assunto limita-se às enzimas e reações bioquímicas que ocorrem durante a fotossíntese  $C_4$ .

Diferentemente da cana-de-açúcar, onde a quantidade de informações sobre os mecanismos fotossintéticos ainda são limitantes, em milho existem diversos trabalhos que exploram o assunto (Cahoon et al., 2008; Li et al., 2010; Majeran et al., 2010; Chang et al., 2012). Dessa forma, se faz necessário um estudo detalhado do estabelecimento da fotossíntese ao longo da folha da cana-de-açúcar.

Um dos principais motivadores para a execução desse projeto foram os resultados obtidos pela Dra. Lucia Mattiello durante o trabalho intitulado “Análise comparativa de parâmetros fisiológicos e dos padrões transcricionais de diferentes estágios de desenvolvimento da folha +1 de cana-de-açúcar”. Neste projeto foi verificado que em diferentes segmentos da folha +1 de cana-de-açúcar (variedade SP80-3280), existe variação da atividade fotossintética tanto em resposta a diferentes intensidades de luz quanto em resposta a diferentes concentrações de  $CO_2$ . Contudo, essa diferença não está associada com uma possível alteração do número de estômatos entre os segmentos, pois a diferença numérica entre os mesmos não foi significativa.

Os cloroplastos são os plastídeos mais importantes presentes nas células vegetais, pois comportam estruturas responsáveis pela fotossíntese (Vicanková e Kutík, 2005). No tecido foliar das plantas  $C_4$  como, o milho e a cana-de-açúcar, essa organela está distribuída nas células do mesófilo e na bainha do feixe vascular, apresentando conformações distintas. Nas células do mesófilo, são ricos em tilacóides com granas largas, enquanto que na bainha do feixe vascular, os cloroplastos apresentam pouco ou nenhum tilacóide, porém é rico em vacúolos de reserva de amido, estrutura totalmente ausente nos cloroplastos do mesófilo.

Estudos anatômicos são considerados excelentes ferramentas para avaliar alterações celulares causadas pela ação de substâncias químicas bem como evidenciar diferenças anatômicas importantes, que muitas vezes podem fazer parte de um comportamento fisiológico diferenciado presente em grupos de plantas específicos, como é o caso das células Kranz encontradas nas gramíneas com metabolismo fotossintético  $C_4$ . Black Jr. et al. (1971) evidenciaram com auxílio de técnicas de microscopia de luz e

eletrônica de transmissão, que o número de cloroplastos presentes nas células da bainha é um critério anatômico que determina a capacidade fotossintética de algumas plantas  $C_4$ . Além disso, em folhas de milho, as células da bainha apresentam parede celular espessa, o que gera alta resistência contra o vazamento de  $CO_2$  e conseqüentemente aumenta a fixação de tal composto e aumenta a produção de biomassa (Majeran et al., 2010).

Nesse contexto, o presente projeto tem como objetivo, realizar análises anatômicas em diferentes segmentos da folha +1 de cana-de-açúcar através de microscopia de campo claro e microscopia eletrônica de transmissão. Através dessas técnicas pretendemos observar o tamanho do feixe vascular, a distância entre feixes, tamanho médio de células e o número e tamanho dos cloroplastos presentes nas células do mesófilo e da bainha do feixe vascular, assim como observar a espessura da parede (camada de suberina) nas células da bainha vascular e correlacionar tais observações com a capacidade fotossintética  $C_4$  presente em folhas de cana-de-açúcar.

Para isto, o aluno de IC irá desenvolver habilidades e aprender técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

## Material e Métodos

### *Material Vegetal*

As plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 serão cultivadas a partir de toletes obtidos de colmos gentilmente cedidos pelo CTC (Piracicaba, SP). Os colmos serão seccionados de modo a cada um possuir apenas uma gema e serão plantados em vasos plásticos (cerca de 2L) com substrato Plantmax® e vermiculita na proporção 1:1. A cada 15 dias as plantas germinadas serão adubadas com N:P:K na proporção 18:00:27 de acordo com especificações do Centro de Tecnologia Canaveira. Os vasos serão regados diariamente e semanalmente a distribuição dos vasos dentro da casa de vegetação foi alterada para aleatorizar as parcelas.

Para os experimentos utilizaremos plantas com cerca de 60 dias após o plantio.

### *Coleta de segmentos foliares*

Após os dois meses de crescimento das plantas, o comprimento da folha +1 de cada uma delas será aferido. Para a coleta dos segmentos serão calculadas as regiões nas quais as folhas serão divididas em três terços iguais e cada terço terá seu meio calculado. As amostras serão coletadas a 1cm de cada lado do meio de cada terço foliar além dos dois primeiros centímetros de cada folha, totalizando 4 segmentos por folha.. Os segmentos serão acondicionados em tubos contendo álcool 70% para conservação e imediatamente submetidos a vácuo em dissecador por 12 horas e armazenados a 4°C até a utilização.

### *Preparo das amostras para microscopia de luz*

Para a confecção das lâminas, o material será transferido para etanol 50% e, em seguida, serão mantidos em uma série etanol/butanol, da concentração 50 à 100%, por duas horas em cada solução. Após este procedimento, o material será colocado em butanol 100% por 12 horas em temperatura ambiente e, após nova troca de butanol 100%, por 2 horas em estufa a 58°C. Para a inclusão em parafina, o material será colocado em soluções gradativas de butanol e parafina até parafina pura, sendo mantidos em cada

solução por 3 horas, em estufa a 58°C. Para o emblocamento, serão utilizadas pequenas caixas de papel preenchidas com parafina derretida, onde o material será colocado separadamente e mantido em temperatura ambiente até seu endurecimento.

Os materiais serão cortados em micrótomo rotativo e os cortes colocados em lâminas histológicas com adesivo de Bissing, para a aderência. Após a secagem em estufa a 40°C, as lâminas serão colocadas em acetato de butila em banho-maria (60°C) para a desparafinação durante uma hora. Em seguida, as lâminas serão hidratadas até etanol 50%, coradas com Azul de Astra por uma hora, lavadas em etanol 50% por alguns segundos, coradas em Safranina por 40 minutos, desidratadas novamente até álcool 100%, colocadas em solução de acetato de butila/etanol 100%, acetato de butila 100% e colocadas em estufa para secagem final. Após estes procedimentos, as lâminas serão montadas em bálsamo do Canadá e cobertas com lamínula para a observação em microscópio de luz.

#### *Preparo das amostras para microscopia eletrônica de transmissão*

Seções de 0.5 µm serão obtidas com auxílio de um ultramicrotomo e coradas com corante múltiplo Paragon. As lâminas serão acopladas sobre uma placa quente (100°C) por 30s, aproximadamente e lavadas com água destilada e secadas em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas serão tratadas com acetato de uranila e citrato de chumbo para dar início às observações no microscópio eletrônico de transmissão.

#### Referências Bibliográficas

- Black, JR. C.C., Mollenhauer, H.H. (1971). Structure and Distribution of Chloroplasts and Other Organelles in Leaves with Various Rates of Photosynthesis. *Plant. Physiol.* 47, 15-23.
- Cahoon, A. B., et al. (2008). "Nuclear, chloroplast, and mitochondrial transcript abundance along a maize leaf developmental gradient." *Plant Mol Biol* 66(1-2): 33-46.
- Carson, D., et al. (2002). "Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue." *Plant Science* 162(289-300).
- Casu, R. E., et al. (2004). "Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling." *Plant Mol Biol* 54(4): 503-517.
- Casu, R. E., et al. (2003). "Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis." *Plant Mol Biol* 52(2): 371-386.
- Casu, R. E., et al. (2007). "Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling." *Funct Integr Genomics* 7(2): 153-167.
- Chang, Y. M., et al. (2012). "Characterizing Regulatory and Functional Differentiation between Maize Mesophyll and Bundle Sheath Cells by Transcriptomic Analysis." *Plant Physiol.*
- Li, P., et al. (2010). "The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome." *Nat Genet* 42(12): 1060-1067
- Lima, D., et al. (2001). "Patterns of expression of cell wall related genes in sugar cane." *Genetics and Molecular Biology* 24((1-4): 191-198.
- Majeran, W., et al. (2010). "Structural and metabolic transitions of C4 leaf development and differentiation defined by microscopy and quantitative proteomics in maize." *Plant Cell* 22(11): 3509-3542.
- Moore, P.H. (1995) Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane stem. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 661-679.
- Vicanková, A., Kutík, J., (2005). Chloroplast ultrastructural development in vascular bundle sheath cells of two different maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Plant Soil Environment*, 51, 491-495.