

REVIEW

ANATOMIA FOLIAR DE FORRAGEIRAS E A SUA RELAÇÃO COM O VALOR NUTRITIVO

Kelen Cristina Basso^{1}, Leandro Martins Barbero²*

RESUMO

Procedimentos adicionais no estudo de gramíneas são necessários para melhorar o desempenho animal nas regiões tropicais do Brasil, pois o aumento no consumo voluntário de forragem está relacionado ao volume de parede celular nas lâminas foliares, referentes aos tecidos vasculares, esclerênquima, células da bainha parenquimática dos feixes, que nas gramíneas C₄ apresentam-se bem desenvolvidas e podem influenciar na acessibilidade dos microrganismos no rúmen. Soma-se a este fato as mudanças no valor nutritivo e na estrutura do pasto, que variam ao longo das estações do ano e podem estar correlacionadas a proporção e distribuição desses tecidos. Os tecidos se diferenciam na planta por diversos fatores, um deles é a presença ou não de parede celular secundária, outro fator importante é o arranjo que existe entre eles e que pode gerar barreiras aos microrganismos do rúmen, limitando a digestão. Por isso, é muito importante conhecer a anatomia das forrageiras, não apenas com o objetivo de adequar estratégias de manejo, tratamentos físicos e químicos, ajudar na seleção e melhoramento de forrageiras, mas também explicar as respostas obtidas com o desempenho animal, e este talvez seja o principal objetivo de se conhecer tais barreiras por meio do estudo da anatomia foliar. Esta revisão tem como objetivo expor algumas diferenças entre plantas de ciclo C₃ e C₄, com principal ênfase nas características anatômicas, avaliadas por meio da microscopia de luz e eletrônica, além de demonstrar a importância dos tecidos que constituem as lâminas foliares

e suas funções específicas e relações com o valor nutritivo.

Palavras-chave: Gramíneas, Microscopia de luz, Porcentagem de tecidos.

INTRODUÇÃO

Os ruminantes têm como fonte principal de energia a parede celular das forrageiras, por isso, é muito importante conhecer as barreiras que limitam a utilização de gramíneas e leguminosas, não apenas com o objetivo de adequar estratégias de manejo, tratamentos físicos e químicos, ajudar na seleção e melhoramento de forrageiras, mas também explicar as respostas obtidas com o desempenho animal, e este talvez seja o principal objetivo de se conhecer tais barreiras por meio do estudo da anatomia foliar.

A parte mais consumida das forrageiras pelos animais são as folhas, estas são diferentes quanto à proporção de tecidos e os componentes das paredes celulares entre as espécies, estágio vegetativo, época do ano e podem ocorrer mudanças na estrutura anatômica devido ao ataque de insetos, doenças e condições de estresse como mecanismo de sobrevivência ou tolerância da planta.

Os estudos anatômicos com forrageiras visando a verificar o efeito da anatomia na digestibilidade tiveram início a partir de 1970 (AKIN, 1973). Estes estudos complementam as informações sobre os fatores que interferem na qualidade das forrageiras, visto que nem sempre a análise química, a digestibilidade e estrutura do dossel

*Artigo recebido em: 18/12/2013

Aceito para publicação em: 13/04/2015

¹ Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina

² Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia

*corresponding author: kelen.basso@ufsc.br

explicam todas as variações no consumo das forrageiras (LEMPP, 2007).

A anatomia da folha pode influenciar no valor nutritivo das forrageiras com consequências no desempenho animal, pois os tecidos são diferentes quanto à digestão no rúmen e isto decorre do tipo de parede celular, da localização e distribuição dentro da folha. Alguns tecidos como as células do mesofilo e do floema não possuem parede celular secundária e, portanto, não são passíveis de lignificação, sendo rapidamente digeridas. Os demais tecidos possuem tal parede e podem variar quanto à porcentagem de lignina, celulose e hemicelulose devido aos fatores citados anteriormente e desta forma influenciam na digestibilidade sendo parcialmente ou não degradados no rúmen.

Esta revisão tem como objetivo expor algumas diferenças entre plantas de ciclo C₃ e C₄, com principal ênfase nas características anatômicas, e demonstrar a importância dos tecidos que constituem as lâminas foliares e suas funções específicas.

1. Uso da microscopia de luz e eletrônica no estudo das forrageiras

2.

O estudo interno das estruturas dos vegetais é feito observando-se os cortes

finos de tecido vegetal em microscópio de luz. Lâminas foliares de gramíneas ou leguminosas são coletadas no campo com determinados critérios de amostragem e armazenadas em soluções fixadoras, que promovem a morte das células e sua preservação estrutural em estado próximo do material fresco. As principais substâncias fixadoras são formol, o álcool, iodo, bicromato de potássio e os ácidos acético, pícrico crômico e ósmico. A escolha do uso de soluções depende dos objetivos do trabalho a ser realizado.

A primeira etapa da preparação das lâminas permanentes é a desidratação, onde a solução fixadora é substituída por álcool e a concentração deste aumenta gradativamente, o objetivo é preservar a integridade das células (JOHANSEN, 1940). A segunda etapa é substituir todo o álcool por parafina e posteriormente Paraplast®, este último, é parecido com a parafina, porém com um grau de pureza maior. Depois são feitos pequenos blocos com cada fragmento de célula e levados ao refrigerador.

Cada bloco é identificado e os cortes são realizados em um equipamento chamado micrótomo rotatório, efetuando-se a montagem das lâminas. Esse esquema está demonstrado na figura 1.



Figura 1. Blocos de Paraplast® contendo os fragmentos de folhas, micrótomo rotatório e montagem das lâminas nas dependências do laboratório de bromatologia da UFGD. (Fonte: Basso, K.C. Arquivo pessoal).

Existem muitos tipos de coloração de tecidos vegetais, o uso de corantes é

necessário para evidenciar as estruturas celulares, resultando em maior facilidade

para observação. Alguns reagentes são empregados para a definição do tipo de substância encontrada em alguns tipos de células. A safranina cora os tecidos que contém lignina de vermelho, pois reage com essas fibras, o Azul de Astra ou o Azul de Alciano reage com as paredes celulósicas corando-as de azul na ausência de lignina (BUKATSCH, 1972). Os tecidos ricos em cloroplastos e que não possuem lignina são coloridos pelo Fast Green (BERLYN e MIKSCH, 1976).

Após o processo de coloração e finalização da montagem são tiradas as fotos das seções transversais em microscópio óptico acoplado a um computador com um programa de medida de imagens específico. Primeiro mede-se toda a área da seção no vídeo e depois os tecidos em uma sequência pré-definida.

No preparo de amostras destinadas a visualização ao microscópio eletrônico de varredura ou de transmissão, as coletas são realizadas da mesma maneira, porém os fragmentos são armazenados na solução de glutaraldeído e o processo de preparo dessas amostras difere muito da microscopia de luz. Esses microscópios são mais utilizados na visualização de matérias resultantes de incubação, com o objetivo de identificar o grau de degradação das paredes celulares e dos tecidos.

A microscopia eletrônica de varredura tem sido utilizada para estabelecer uma base entre a parede celular e a digestibilidade de forragens, assim como de grãos, pois possibilita a observação e registro da imagem tridimensional. Já a de transmissão permite verificar-se as inter-relações específicas entre as membranas de células de vegetais, os microrganismos e a forma em que é degradada a forragem ou grãos, visto apresentar alto poder de resolução (LEMPP, 2007).

3. Tecidos vegetais

2.1. Descrição dos tecidos vegetais

Os tecidos da lâmina foliar são diferenciados em tecidos de revestimento, condutor, assimilatório e de sustentação,

que estão descritos a seguir e podem ser observadas nas figuras 2, 3 e 4.

Epiderme: formada por uma camada compacta de células que reveste o corpo das plantas. Sua parede celular apresenta espessura variável com a maturidade e a fração da planta (QUEIROZ, 1997). A epiderme na face adaxial é aquela que cobre a parte superior da lâmina foliar contendo as células bulbiformes que são responsáveis por regular o turgimento da folha. Na epiderme da face abaxial, estão os cloroplastos. Ambas são passíveis de espessamento da parede celular com o aumento da quantidade de lignina, sílica, cera e cutina. O meio mais comum e rápido de colonização dos fragmentos foliares no rúmen pelos microrganismos é por meio do desprendimento ou ruptura da epiderme, por isso, é importante avaliar além da proporção desses tecidos na folha, o arranjo da epiderme com as células adjacentes como esclerênquima e bainha parenquimática dos feixes, o que será discutido ao longo do texto (WILSON, 1993).

Mesofilo: Compreende todos os tecidos situados entre a epiderme e o sistema vascular da folha. Formado por células de parede delgada não lignificada. O mesofilo é um dos primeiros tecidos a sofrer digestão, embora tal processo seja mais rápido nas forrageiras de clima temperado (HANNA et al., 1973).

Em leguminosas e gramíneas de clima temperado, as células do mesofilo são esparsamente arranjadas, apresentando poucos pontos de aderência entre si e divide-se em parênquima paliádico e lacunoso (Figura 2). Isso facilita a fragmentação pela mastigação e a separação dos outros tecidos, como os feixes vasculares e epiderme. Permite, ainda, rápido acesso aos microrganismos do rúmen. Nas gramíneas tropicais, a epiderme está firmemente aderida aos feixes vasculares pelo esclerênquima, dificultando o processo de fragmentação das partículas pela mastigação e ruminação e reduzindo o acesso dos microrganismos

do rúmen às células do mesofilo (QUEIROZ, 1997).

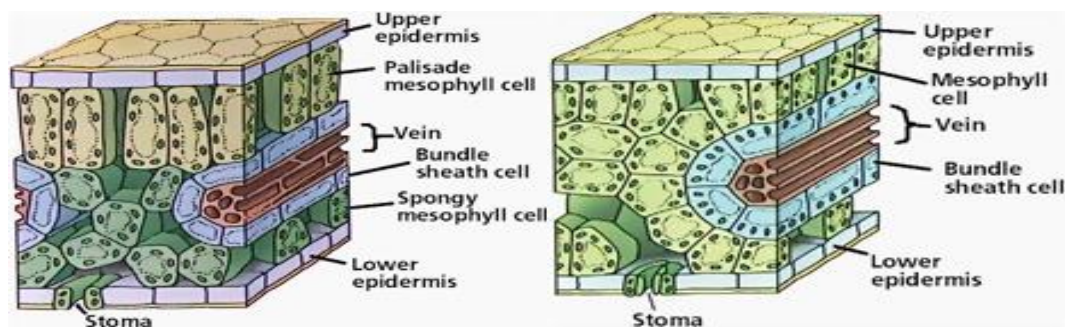


Figura 2. Anatomia foliar de C_3 (esquerda) e C_4 (direita). Imagen de: Purves et al., 2001. **Life: The Science of Biology**, 4^o Ed., Sinauer Associates (www.sinauer.com) e WH Freeman (www.whfreeman.com).

Bainha parenquimática dos feixes (BPF): Constitui um grupo de células especializadas, ricas em cloroplastos, e envolvidas no processo assimilatório, circunda os feixes vasculares nas espécies C_4 (anatomia Kranz). Uma bainha de células também circunda os feixes vasculares nas espécies C_3 ; entretanto, é pouco desenvolvida, desprovida de cloroplastos e facilmente digerida pelos microrganismos do rúmen (WILSON, 1993).

A digestibilidade da BPF varia consideravelmente entre os grupos C_3 e C_4 e entre espécies do grupo C_4 . Entre gramíneas C_3 e C_4 do gênero *Panicum*, a BPF parece ser uma importante causa da variação na digestibilidade, uma vez que essas células possuem baixa digestão devido ao espessamento da parede celular secundária, e isto, associado à alta proporção deste tecido nas espécies C_4 , refletirá na taxa de degradação e reduzirá a digestão da matéria seca (AKIN et al., 1983).

Tecido vascular: O tecido vascular compreende as células do floema, xilema e fibras associadas. As células do floema, as quais apresentam parede celular delgada, são ricas em conteúdo celular e rapidamente digeridas pelos microrganismos do rúmen (WILSON, 1993). As células do xilema e das fibras apresentam parede celular espessada, sendo destituídas de conteúdo celular. No colmo, normalmente, há um anel de células esclerenquimáticas circundando o feixe vascular, caracterizado também como tecido vascular (QUEIROZ, 1997).

Esclerênquima: É formado por células que desenvolvem grossa parede celular, que se tornam progressivamente lignificadas. Em gramíneas, a parede secundária varia de 2 a 5 μm de espessura (WILSON, 1993). Em folhas de gramíneas, o esclerênquima ocorre acima e abaixo dos feixes vasculares, enquanto no colmo ele forma uma capa de células envolvendo cada feixe vascular e, com a maturidade, um anel subepidérmico circundando todos os feixes.

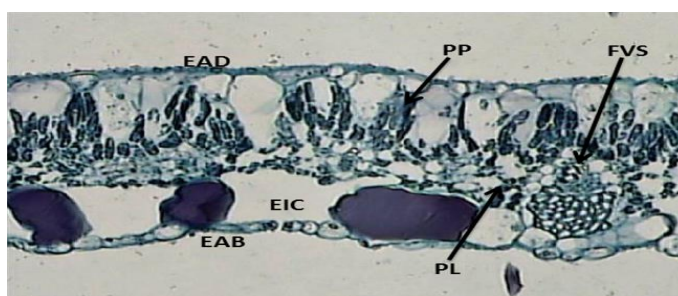


Figura 3. Corte transversal da lâmina foliar de *Stylosanthes guianensis* cv. Bandeirantes (C_3); EAD – Epiderme adaxial; EAB – Epiderme abaxial; FVS – Feixe vascular secundário; PP – Parênquima paliçádico; PL – Parênquima lacunoso; EIC – Espaço intercelular. (Adaptado de DUBEUX Jr. et al., 2009).

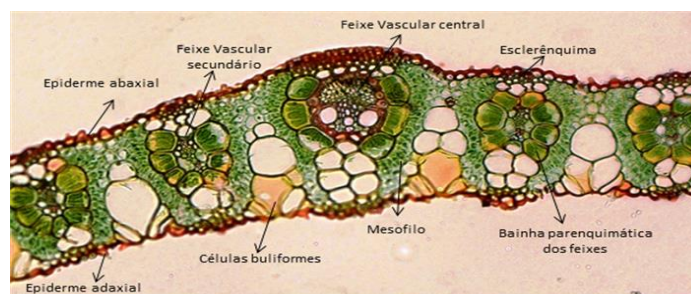


Figura 4. Seção transversal da lâmina foliar de Tifton-85 (*Cynodon* spp)(C_4) manejado sob diferentes índices de área foliar residual, pastejado por ovinos (BASSO et al., 2011a).

2.2. Digestão dos tecidos e sua correlação com o valor nutritivo

As taxas de digestão variam entre os tecidos e de acordo com o arranjo destes dentro da lâmina foliar. A proporção de tecidos é mais comumente medida como a área relativa em secções transversais das frações da planta. AKIN e AMOS (1975) demonstraram que as células do mesofilo e as do floema, de parede celular delgada, não passíveis de lignificação, digeridas nas Tabelas 1. Classificação dos tecidos quanto a sua digestão.

primeiras 12 horas de incubação, enquanto as da epiderme e as da bainha parenquimática dos feixes são de digestão lenta e parcial, podendo levar de 12 a 72 horas de digestão dependendo da espessura das paredes secundárias das células da bainha. O esclerênquima e o xilema, que apresentam parede celular espessa e lignificada, são indigestíveis (AKIN, 1989) (Tabela 1).

Gramíneas	Digestão relativa dos tecidos*		
	Rápida	Lenta e parcial	Não degradada
Tropicais	MES	EPI	XIL
	FLO	BPF	ESC
Temperadas	MES		
	FLO	BPF	XIL
	EPI	ESC	ESC
	BPF		

*Perda de tecidos determinada por microscopia eletrônica de varredura ou transmissão. MES - mesofilo, FLO - floema, EPI - epidermes, BPF - bainha parenquimática dos feixes, ESC - esclerênquima, XIL - xilema, BPF – bainha interna dos feixes. Fonte: Compilada de AKIN, 1989.

Devido ao arranjo paralelo longitudinal das principais estruturas de tecidos, essas medidas aproximam-se bem do volume de cada tipo de tecido, exceto para folhas de leguminosas, em função dos feixes vasculares estarem disposto de forma ramificada, onde as nervuras mais delgadas vão divergindo de outras de maior calibre, comum em dicotiledôneas e denominada de venação reticulada (WILSON, 1993). Entretanto, a proporção

de tecidos normalmente não leva em conta espaços intercelulares de ar ou a espessura e o grau de lignificação da parede celular nos vários tecidos. Consequentemente, a proporção de tecidos nem sempre explica pequenas diferenças na digestibilidade *in vitro* da matéria seca entre espécies ou cultivares (QUEIROZ, 1997).

As células do mesofilo contêm alto teor de proteína bruta no conteúdo celular e carboidratos digestíveis na parede,

podendo ser degradados por enzimas extracelulares, pois apresentam somente a parede celular primária, com espessura de 0,1 a 0,2 μm e não são lignificáveis (CHENG et al., 1980). Em geral, a proporção de mesofilo está positivamente correlacionada à digestibilidade e, negativamente, ao teor de fibra em detergente neutro (PACIULO et al., 2001; WILSON & HATFIELD, 1997).

Alguns tecidos permanecem intactos depois de prolongado tempo de incubação *in vitro*, indicando que algumas características da estrutura das lâminas foliares poderiam limitar a degradação dos tecidos pelos microrganismos do rúmen (WILKINS, 1972). Uma delas refere-se ao arranjo da BPF, cujas células possuem alto teor de proteína e amido em seu conteúdo e podem estar associadas à lignina, como também as da epiderme (EPI) que são as mais resistentes à degradação, requerendo inicialmente o ataque físico (VAN SOEST, 1994).

O conteúdo das células da BPF pode não estar disponível aos

microrganismos do rúmen pelo espessamento das paredes celulares e a formação de estrutura girder I ou T (WILSON e HATFIELD, 1997). Denomina-se estrutura girder I quando o ESC está localizado entre as EPI, adaxial e abaxial, e as células da BPF, e girder T quando está entre a EPI, adaxial ou abaxial, e a BPF (figura 5).

O desempenho das cultivares do gênero *Panicum* spp, massai e mombaça, sob pastejo, foi avaliado por EUCLIDES et al., (2008) e verificaram um pior desempenho dos animais mantidos nos pastos da cultivar massai, devido ao menor valor nutritivo dessa cultivar. Ao avaliar os arranjos dos tecidos na lâmina foliar desses capins, após 72 horas de incubação *in situ*, LEMPP et al., (2007) observaram alta frequência de células da bainha intactas e fragmentos laminares ainda estruturados, indicando que, nas lâminas foliares de massai, existe alguma restrição à digestão, confirmada pela menor digestibilidade da matéria orgânica devido a maior frequência de estrutura girder I.

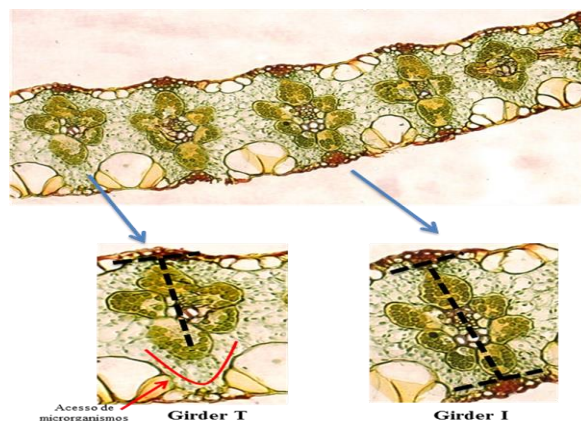


Figura 5. Seção transversal da lâmina foliar de *Panicum maximum* cv. Tanzânia pastejado por caprinos sob diferentes intensidades de desfolha (BASSO et al., 2011b).

As células do xilema que compõem parte do tecido vascular são resistentes à digestão, em qualquer estágio vegetativo da planta (AKIN, 1989). Essas, junto com a epiderme e o anel esclerenquimático no colmo e esclerênquima na folha de gramíneas C_4 , formam uma consistente estrutura que limita a digestão, formando uma barreira inerte ao ataque microbiano. Diversos trabalhos mostram que a proporção de tecido vascular, em secções

de lâmina e bainha foliares e colmo, está negativamente correlacionada à digestibilidade (QUEIROZ et al., 2000).

Segundo WILSON e HATFIELD (1997) técnicas baseadas na perda total das células são insensíveis para avaliar a digestão do esclerênquima e tecido vascular, uma vez que estes tecidos não perdem a integridade mesmo após longos períodos de incubação. De qualquer modo, o esclerênquima forma, ao lado do tecido

vascular, os principais componentes da fibra encontrada nas fezes de ruminantes.

As células da BPF representam geralmente de 20 a 35% da seção transversal, sendo que essas células geralmente são associadas com o acúmulo de biomassa, com seu aumento ocorre também aumento na largura das folhas e na área foliar (LEMPP, 2007). Assim, a quantificação da área ocupada pelos tecidos da BPF em uma seção transversal pode ser bom indicativo do valor nutricional, pois possibilita identificar as cultivares que poderão influenciar na maior digestibilidade em função da produção de tecidos lignificados.

Os fatores estruturais da forragem, de origem anatômica, relacionados à qualidade de lâminas foliares são vários, impossibilitando que características individuais, como a proporção de tecidos altamente digestíveis, como o mesofilo, possa distinguir os genótipos de maior valor nutricional (LEMPP et al., 2009). Da mesma forma, os resultados da composição química, quando associados ao estudo dos arranjos dos tecidos gera resultados mais completos, pois no processamento das amostras, moagem, elimina-se o efeito da resistência física dos constituintes da parede celular.

WILSON et al., (1989) verificaram que genótipos de *Cenchrus ciliaris* com folhas mais pesadas e com alta área foliar específica (g de MS cm⁻²) foram associadas às maiores proporções de tecidos de paredes espessas (BPF+TV+ESC) na seção transversal da lâmina foliar. Porém, ainda são poucos os estudos realizados para avaliar a estrutura de lâminas foliares e principalmente sua correlação com os atributos morfofisiológicos e químicos.

O colmo das gramíneas consiste, externamente, da epiderme que delimita um tecido parenquimatoso, no qual se encontram dispersos os feixes vasculares envolvidos por um anel esclerenquimático. Os feixes vasculares são similares àqueles encontrados nas folhas, normalmente apresentando um anel de fibras circundando cada feixe. Nos estádios

iniciais de desenvolvimento, somente o xilema é lignificado, contudo, com a maturação, há progressiva lignificação que inclui o anel esclerenquimático e, num estágio mais avançado, até o parênquima em que os feixes estão inseridos (AKIN, 1989).

4. Principais diferenças entre gramíneas C₃ e C₄

As plantas C₃ tem como primeiro composto estável da fotossíntese um composto com três carbonos, sendo consideradas aquelas plantas que possuem somente a enzima RUBISCO, pertencente ao Ciclo de Calvin, como alternativa para a fixação do carbono. A reação de carboxilação da RUBISCO resulta na produção de duas moléculas do mesmo composto de três carbonos (Glicerato 3-fosfato) e este grupo é composto pela maior parte das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Algumas plantas, principalmente gramíneas e parte das bromélias, desenvolveram um sistema complementar à via C₃ chamado de via C₄. Este sistema permite à folha o armazenamento de ácidos com quatro carbonos antes de estes serem captados pela RUBISCO. Neste caso há uma mudança morfológica importante que é a existência da bainha parenquimática dos feixes (Figura 2).

Nas plantas C₄ o gás carbônico é captado nas células do mesofilo pela enzima FosfoEnol Piruvato carboxilase (PEPc) formando um composto de 4 carbonos que poderá ser descarboxilado a 3PGA e usado pela RUBISCO, presente nas células da bainha. Nestas células, o ácido (Malato, por exemplo) é descarboxilado, formando CO₂ novamente. Este mecanismo causa um aumento na concentração de CO₂ na célula da bainha em relação à do mesofilo. Com isto, a RUBISCO fica em uma situação em que a concentração de substrato é muito alta, evitando a competição do oxigênio que leva à fotorrespiração.

Outra característica importante nas gramíneas de ciclo C₄ é que as paredes externas das células da epiderme tornam-se

espessas, lignificadas e cobertas com uma camada de cutícula e cera, à medida que se desenvolvem, sendo mais pronunciado na epiderme abaxial que na adaxial (WILSON, 1993). Efeito esse comprovado com a diminuição no valor nutritivo que ocorre com o aumento da idade da planta, fator que é maximizado na época das secas, devido à estacionalidade de produção já conhecida das gramíneas tropicais (EUCLIDES et al., 2008; VELASQUEZ et al., 2010).

AKIN et al., (1983) comparando gramíneas C₃, C₄ e tipos intermediários C₃/C₄ do gênero *Panicum*, cultivadas no mesmo ambiente verificaram que as espécies C₃ apresentaram maiores proporções de mesófilo e menores de esclerênquima, tecido vascular e epiderme do que as C₄.

No rúmen as bactérias, protozoários e fungos colonizam praticamente todas as partículas que chegam digerindo inicialmente as células do mesófilo e do floema. Nestes tecidos as células possuem apenas uma delgada parede primária. Estes tipos de células não apresentam incrustação por lignina e são facilmente fragmentadas e completamente digeridas.

I. Considerações finais

II.

Utilizar técnicas como a microscopia de luz e eletrônica com o objetivo de conhecer a proporção de tecidos e seu arranjo dentro da planta por meio da anatomia foliar é uma importante ferramenta de auxílio na pesquisa com forrageiras, pois fornece maior quantidade de dados e colabora no entendimento dos resultados obtidos em experimentos de desempenho animal.

De posse dos dados gerados por estas técnicas, os profissionais que trabalham com melhoramento de plantas forrageiras e até mesmo os que trabalham com manejo de pastagens, podem usar das informações para um melhor entendimento sobre as características anatômicas determinadas pela genética de cada planta ou até mesmo as características anatômicas influenciadas pelo manejo da pastagem.

Com as informações obtidas com relação à anatomia pode-se chegar a interpretações do ponto de vista nutricional, estimando-se as respostas no que diz respeito à produção animal de acordo com uma planta submetida a uma determinada condição de meio, ou seja, a genética da forrageira aliada à condição de manejo que ela é submetida.

LEAF ANATOMY OF FORAGE AND ITS RELATIONSHIP WITH THE NUTRITIONAL VALUE

ABSTRACT

Additional procedures in the study of grasses are needed to improve animal performance in tropical regions of Brazil, as the increase in voluntary forage intake is related to the volume of the cell wall in leaf blades, referring to the vascular tissue, sclerenchyma, parenchyma bundle sheath cells, the C₄ grasses which have become well developed and can influence the accessibility of rumen microorganisms. Added to this fact changes in nutritive value and sward structure, which vary throughout the seasons and can be correlated to the proportion and distribution of these tissues. This tissue differs in the plant by several factors, one of them is the presence or absence of secondary cell wall, another important factor is the arrangement that exists between them and that can generate barriers to the ruminal microorganisms, limiting digestion. So it is very important to know the anatomy of the forage, not only with the aim of adapting management strategies, physical and chemical treatments, selection and breeding of forage, but also explain the responses obtained with the animal performance, and the latter perhaps the main goal of understanding these barriers through the study of leaf anatomy. This review aims to expose some differences between C₃ and C₄ plants cycle, with main emphasis on anatomical characteristics evaluated by light and electron microscopy, as well as demonstrating the importance of the tissues

that form the leaf blades and their specific functions.

KEYWORDS: Grasses, Light microscopy, Percentage of tissue.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Beatriz Lempp (Universidade Federal da Grande Dourados) pelo apoio nas pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIN, D.E. Histological and physical affecting digestibility of forages. **Agronomy Journal**, v.21, p.17-25, 1989. <http://dx.doi.org/10.2134/agronj1989.00021962008100010004x>
- AKIN, D.E. Rumen microbial degradation of grass tissue revealed by scanning electron microscopy. **Agronomy Journal**, v.65, p.825-828, 1973. <http://dx.doi.org/10.2134/agronj1973.00021962006500050045x>
- AKIN, D.E., AMOS, H.E. Rumen bacterial degradation of forage cell walls investigated by electron microscopy. **Applied Microbiology**, v.29, n.5, p.692-701, 1975.
- AKIN, D.E.; WILSON, J.R.; WINDHAM, W.R. Site and rate of tissue digestion in leaves of C3, C4, and C3/C4 intermediate *Panicum* species. **Crop Science**, v.23, n.1, p.147-155, 1983. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1983.0011183X002300010042x>
- BASSO, K.C.; LEMPP, B.; BALDI, F.; LEMOS, N.L.; ALARI, F.O.; REIS, R.A. Anatomia foliar de capim Tanzânia manejado sob crescentes índices de área foliar residual. Simpósio de Nutrição Animal a Pasto. **Anais... Maringá-PR**, 2011b.
- BASSO, K.C.; REIS, R.A.; LEMPP, B.; BALDI, F.; COSTA, J.P.R.; SILVA, W.L. Proporção de tecidos de lâminas foliares de capim Tifton 85 pastejado por ovinos em diferentes intensidades de desfolha. I Simpósio de Nutrição Animal a Pasto. **Anais... Maringá-PR**, 2011a.
- BERLYN, G.P.; MIKSCHE, J.P. Botanical microtechnique and cytochemistry. **Ames, The Iowa State Press**, 326p., 1979.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 8, p. 255, 1971.
- CHENG K.J.; FAY, J.P.; HOWARTH, R.E. Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. **Applied Environment Microbiology**, n. 40, p. 613-625, 1980.
- DUBEUX Jr, J.C.B., SILVA, V.J., LEMPP, B. et al. Anatomia e proporção de tecidos de lâminas foliares de espécies de *Stylosanthes cultivadas na Zona da Mata Seca de Pernambuco*. 46º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais... Maringá – PR**, 2009.
- EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; ZIMMER, A.H.; JANK, L.; OLIVEIRA, M.P.de. Avaliação dos capins mombaça e massai sob pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 37, n.1, Viçosa, 2008.
- HANNA, W.W.; MONSON, W.G.; BURTON, G.W. Histological examination of fresh leaves after in vitro digestion. **Crop Science**, v.13, n.1, p.98-102, 1973. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1973.0011183X001300010031x>
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Co. Inc., 523 p., 1940.
- LEMPP, B. ; CATIAN, G. ; BATISTA, L. A. R. ; GOMES, R. A. ; CEOLIN, A. C. . Atributos anatômicos de lâminas foliares

de *Paspalum* spp. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 46, 2009. **Anais...** Maringá: SBZ, 2009.

LEMPP, B. Avanços metodológicos da microscopia na avaliação de alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.315-329, 2007.

LEMPP, B.; EUCLIDES, V.P.B.; MORAIS, M.G. et al. Avaliações do resíduo da digestão de três cultivares de *Panicum maximum*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 37, 2000. **Anais...** Viçosa, MG: SBZ, 2000.

PACIULLO, D.S.C., GOMIDE, J.A., QUEIROZ, D.S., SILVA, E.A.M. da. Correlações entre componentes anatômicos, químicos e digestibilidade *in vitro* da matéria seca de gramíneas forrageiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, supl. 1, 2001.

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

QUEIROZ, D.S., GOMIDE, J.A., MARIA, J. Avaliação da folha e do colmo de topo e base de perfilhos de três gramíneas forrageiras. 1. Digestibilidade *in vitro* e composição química. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p.53-60, 2000. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982000000100008>

SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. A simple method that uses differential staining and light microscopy to assess the selectivity of wood delignification by white rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.4, p.1383-1386, 1994.

TAIZ, L & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed. Porto Alegre. ed. Artmed, 2009. VAN SOEST, P.J. **Nutricional ecology of the ruminant**. 2nd ed. New

York: Cornell University Press, 1994. 476p.

VELASQUEZ, P.A.T., BERCHIELLI, T.T., REIS, R.A. et al. Composição química, fracionamento de carboidratos e proteínas e digestibilidade *in vitro* de forrageiras tropicais em diferentes idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 6, 2010.

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

<http://dx.doi.org/10.1017/s0021859600026381>

WILSON, J. R. & HATFIELD, R. D. Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: consequences for fibre degradation by rumen micro flora. **Journal of Agriculture**, Aust., v.48, p.165-180, 1997.

WILSON, J. R.; HATFIELD, R. D. Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: consequences for fibre degradation by rumen micro flora. **Journal of Agriculture**, Aust., v.48, p.165-180, 1997.

WILSON, J.R. Organization of forage plant tissues. In: JUNG, H.G., BUXTON, D.R. HATFIELD, R.D. et al. (Eds.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA-CSSASSSA, 1993. p.1-27.

WILSON, J.R.; AKIN, D.E.; McLEOD, M.N. et al. Particle size of leaves of a tropical and temperate grass by cattle. II. Relation of anatomical structure to the process of leaf breakdown through chewing and digestion. **Grass and Forage Science**, v.44, n.1, p.65-75, 1989. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2494.1989.tb01911.x>

WILSON, J.R.; BROWN, R.H.; WINDHAM, W.R. Influence of leaf

anatomy on the dry matter digestibility of C3, C4, and C3/C4 intermediate types of *Panicum* species. **Crop Science**, v.23, n.1, p.142-146,1983.
<http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1983.0011183X002300010041x>