



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**ESTUDO DE APOMIXIA EM DIFERENTES NÍVEIS DE PLOIDIA NO**  
***MANIHOT spp.***

Adalgisa Maria Chaib Ferreira

Orientador: Nagib M. A. Nassar

Brasília,

20 de junho de 2011

Adalgisa Maria Chaib Ferreira

**ESTUDO DE APOMIXIA EM DIFERENTES NÍVEIS DE PLOIDIA NO**  
***MANIHOT spp.***

Dissertação submetida à Universidade de  
Brasília como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. PhD Nagib Mohammed Abdalla Nassar

Brasília

2011

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**Adalgisa Maria Chaib Ferreira**

**ESTUDO DE APOMIXIA EM DIFERENTES NÍVEIS DE PLOIDIA NO  
*MANIHOT***

Dissertação submetida à Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Botânica pelo Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade de Brasília, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:

Nagib Mohammed Abdalla Nassar

Departamento de Genética e Morfologia, UnB

Dalva Graciano Ribeiro

Departamento de Botânica, UnB

Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa

Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia, UFRN

Brasília, junho de 2011

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe, exemplo de força e coragem.

Ao meu pai, meu grande amigo.

À minha filha, doçura que prende meus pés a terra.

Ao meu marido, que é meu porto e embarcação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus todo poderoso, que nos momentos difíceis esteve sempre ao meu lado e da minha família, mostrando que Ele nos deu a vida para sermos felizes, e que de tudo somos capazes.

Sou muito agradecida ao Prof. Nagib. M. N. Nassar, meu orientador, pela paciência e dedicação imensuráveis.

Agradeço ao Dr. Ahmad Youssef, que no final do meu trabalho concedeu enorme ajuda na revisão.

À minha família, em especial aos meus pais e meu marido, que tanto apoio e compreensão tiveram para que eu me dedicasse ao mestrado. E também aos meus irmãos, que mesmo de longe souberam me passar forças para prosseguir.

E por fim agradeço ao CNPq, que proporcionou condições para meus estudos de mestrado por meio da minha bolsa.

# ESTUDO DE APOMIXIA EM DIFERENTES NÍVEIS DE PLOIDIA NO *MANIHOT*

(CHAIB-FERREIRA, A. M.; Mestrado em Botânica)

## Resumo

A apomixia em *Manihot* vem sendo estudada pelo Professor Nassar desde 1995. Estudos têm sido feitos desde então para elucidar os processos genéticos envolvidos nesse fenômeno. No presente estudo foram feitas análises morfológicas em óvulos por meio da técnica de *Clearing*, além da avaliação das configurações cromossômicas e da viabilidade polínica de três variedades: a cultivar 307-2 (diplóide); o híbrido poliplóide entre *Manihot esculenta* Crantz e *M. glaziovii* Arg. Muell.; e do híbrido poliplóide entre *M. esculenta* e *M. anômala* Poll.. Com o intuito de verificar o estágio de desenvolvimento da flor em que se inicia o surgimento do embrião, foram feitas análises com vários tamanhos de flores (entre 2 e 9 mm). Foram feitos três tipos de tratamento, coletas de flores antes da antese, após a antese com proteção de plástico PVC, e após a antese sem proteção para verificar se a polinização induz ou não a apomixia em *Manihot*. Na análise citogenética da cultivar 307-2 foi encontrado pareamento regular de 18 bivalentes na metáfase I. Na análise embriônica foi observado 14% dos óvulos com embriões múltiplos, isto é, 14% de apomixia para flores fechadas, indicando que nesse caso a polinização não foi necessária para a formação de embriões do tipo adventício. No híbrido poliplóide entre *Manihot esculenta* e *M. glaziovii*, foi encontrado número de 72 cromossomos nas 15 metáfases analisadas, sendo notado média de formação de 3 quadrivalentes e 30 bivalentes, confirmando a poliploidização artificial. Quando foram analisados seus óvulos, notou-se um índice de 11% de apomixia, o que indica que a duplicação do material cromossômico interfere na expressão dessa característica, uma vez que no híbrido diplóide não foi encontrado multiembrionismo. No híbrido poliplóide entre *M. esculenta* e *M. anômala* Poll. foi encontrado número de 72 cromossomos sendo representados por 4 univalentes e 28 bivalentes, o que confirma a poliploidização artificial. A análise embriônica mostrou 2% de embriões múltiplos e revelou surgimento de apomixia, que não se encontra no

tipo diplóide. Além disso, na análise polínica foram testados dois corantes diferentes para comparação. A alta viabilidade polínica encontrada demonstra que esse fator não está inversamente relacionado ao aparecimento de apomixia, e que as poliploidizações realizadas restauraram a viabilidade que se havia perdido no híbrido interespecífico. O uso do corante carmina e Alexander no híbrido *M. glaziovii* x mandioca teve o mesmo resultado. Como o corante carmina é muito mais fácil no preparo e na aplicação do que o corante Alexander, recomenda-se o uso do corante carmina no tratamento para determinar a viabilidade de pólen.

Palavras-chave: Pseudogamia, multiembrionismo, aposporia.

# STUDIES ON DIFERENTS PLOIDY LEVELS OF APOMIXIS IN *MANIHOT* *SPP.*

(CHAIB-FERREIRA, A. M.; Mestrado em Botânica)

## Abstract

Apomixis in *Manihot* has been studied by Professor Nassar since 1995. Since then, studies have been made to elucidate the genetic e botanic processes involved in this phenomenon. In the present study, ovules of three varieties were analyzed by the technique of clearing, as well as the evaluation of chromosomal configurations and pollen viability of three types: the cultivar 307-2 (diploid), the polyploid hybrids of *Manihot esculenta* Crantz with *M. glaziovii* Arg. Muell.; and the polyploid hybrid of *M. esculenta* with *M. anomala* Pohl. Various sizes of flowers (between 2 and 9 mm) were analyzed in order to verify if pollination is necessary for multiembrionic formation, and determine at which flower development stage the embryo occurs. Three types of treatment were used: the use of flowers before anthesis; after anthesis with protective PVC plastic; and after anthesis without protection, to check whether or not pollination induces apomixis in *Manihot*. The cultivar 307-2 revealed regular 18 bivalents at metaphase. The embryonic study showed 14% of apomictic flower buds, indicating that pollination was not necessary for the formation of adventitious embryos. 72 chromosomes were found in polyploid hybrids of *Manihot esculenta* with *M. glaziovii*. In the 15 metaphases analyzed, it was noted an average of three quadrivalents and 30 bivalents, confirming the polyploid. The 11% apomixes rate indicates that chromosome duplication has led to apomixes induction. On the polyploid hybrid of *M. esculenta* with *M. anomalous* Pohl, it was found 72 chromosomes constituting 4 univalents and 28 bivalents, confirming the artificial polyploidization. Pollen analysis showed that high pollen viability is not inversely related to the occurrence of apomixes. The carmine dye proved far more reliable and practical for measuring pollen viability.

Key-words: Pseugamy, multiembryos, apospory.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	4
3. Objetivos .....	10
4. Material e métodos.....	11
4.1 Local de Condução dos Experimentos.....	11
4.2 Descrição do material estudado .....	11
4.3 Análises de Apomixia .....	16
4.4 Análise meiótica .....	17
4.5 Análise Polínica .....	18
5. Resultados e discussão.....	21
5.1 Apomixia Da cultivar 307-2 .....	21
5.2 Citogenética da cultivar 307-2.....	22
5.3 Viabilidade polínica da cultivar 307-2.....	22
5.4 Apomixia Do híbrido poliplóide <i>M. esculenta</i> x <i>M. glaziovii</i> .....	26
5.5 Citogenética Do híbrido poliplóide <i>M. esculenta</i> x <i>M. glaziovii</i> .....	27
5.7 Apomixia Do híbrido poliplóide entre <i>M. esculenta</i> e <i>M. anomala</i> .....	31
5.8 Citogenética Do híbrido poliplóide entre <i>M. esculenta</i> e <i>M. anomala</i> .....	32
5.9 Viabilidade de Pólen híbrido poliplóide entre <i>M. esculenta</i> x <i>M. anomala</i> .....	32
6. Conclusão.....	39
7. bibliografia.....	40

## 1. INTRODUÇÃO

A apomixia é um mecanismo de reprodução geneticamente controlado em que ocorre o desenvolvimento do embrião sem a união do núcleo espermático do pólen com a oosfera (Bashaw, 1980). O embrião se desenvolve a partir de células somáticas ou da oosfera não reduzida, tendo exatamente a mesma constituição da planta mãe. Portanto, a planta decorrente é um clone da planta mãe (Asker & Jerling, 1992).

A principal vantagem desse mecanismo para a planta é a fixação de genótipos vantajosos, permitindo a sobrevivência em ambientes hostis sem que a segregação genética a ameace pela perda de importantes características (Koltunow et al., 1995; Nassar et al., 2006).

O cultivo da *M. esculenta* é atualmente propagado de forma vegetativa. Apesar de garantir a heterose por ser um tipo de clonagem, apresenta limitações fitossanitárias. A cada ciclo as estacas utilizadas encontram-se mais contaminadas devido ao acúmulo de vírus e bactérias. Com o passar do tempo, a produtividade e a viabilidade das estacas diminuem, podendo levar a extinção de variedades com importância econômica, que poderiam ser fontes de importantes genes (Nassar, 2000, 2003, 2006a).

Adotar a apomixia na *M. esculenta* surge como uma alternativa para esse problema de duas principais formas. Primeiro por garantir a manutenção de uma certa variedade, evitando segregação genética e mantendo o vigor híbrido. Segundo por possibilitar a utilização de uma semente limpa, desprovida de patógenos. Outros pontos positivos são o armazenamento, o plantio, e o transporte facilitados (Nassar, 1995; Nassar et al., 1997, 2000; Nassar & Collevatti, 2005). Portanto, apesar de escassos, os estudos de apomixia em *Manihot* são muito importantes.

O embrião apomítico pode se desenvolver de duas maneiras diferentes. Quando se origina da célula mãe do megásporo, trata-se de apomixia **gametofítica**. Nesse caso pode haver formação de um saco embrionário não reduzido (diplóide), que pode formar-se por dois caminhos: diplosporia ou aposporia. Já quando o embrião se origina de uma célula somática, trata-se de apomixia **esporofítica** e pode ser também chamada de embrionia adventícia (Asker & Jerling, 1992). Desse modo não há relação com o saco embrionário, e os embriões diplóides desenvolvem-se diretamente a partir de células somáticas do óvulo, não advindas da oosfera.

Vários estudos confirmam a natureza genética da apomixia, mas ela ainda não é uma característica completamente controlada (Ramulu et al., 1999; Ozias-Akins, 2006; Rodrigues & Koltunow, 2005; Dall'agnol & Schifino-Wittmann, 2005). Sua herança é complexa, apesar de aparentemente controlada por poucos genes. Tanto ações gênicas recessivas como dominantes tem sido relatadas para a mesma espécie, ou diferentes espécies. A presença de apomixia pode ser obrigatória ou facultativa na mesma espécie, assim como variações no grau de expressão da apomixia facultativa na espécie (Hanna, 1995).

A apomixia já foi relatada em mais de 35 famílias de plantas (Hanna & Bashaw, 1987). Ocorre principalmente nas famílias Poaceae e Asteraceae, e inclui importantes espécies utilizadas comercialmente, como por exemplo, *Zea mays* (milho), *Triticum sativum* (trigo), *Brachiaria spp.* (braquiara), *Beta vulgaris* (beterraba), *Fragaria vesca* (morango) e *Mangifera austroyunnanensis* (manga).

Algumas espécies silvestres de *Manihot* apresentam apomixia, entre elas *M. glaziovii* (Nassar, 2001; Nassar, 2007). Embora essa característica possa ser transferida pela hibridação interespecífica, a progênie é estéril, ou pode não resultar em combinação gênica desejável, devido à incompatibilidade entre as plantas (Stebbins, 1985).

A poliploidia, que é a duplicação cromossômica em certa planta, vem sendo relacionada à apomixia por alguns autores (Asker & Jerling, 1992; Dall'agnol e Schifino-Wittmann, 2005; Nassar, 2006). Essa também pode ser uma maneira de se restituir a viabilidade de plantas estéreis provenientes de cruzamento interespecífico. Nesse caso, os cromossomos não homólogos, ao serem duplicados, passam a ter um homólogo para realizar o pareamento. Algumas poliploidizações artificiais foram realizadas com sucesso por Nassar e sua equipe, entre as quais estão os híbridos *M. esculenta* Crantz x *M. glaziovii* Muell.-Arg., e *M. esculenta* Crantz x *M. anomala* Pohl (Nassar 1992, 2003).

As espécies silvestres de *Manihot* foram usadas sistematicamente por Nassar desde 1975 no melhoramento da cultura para a hibridação com a *M. esculenta*. Vários híbridos interespecíficos que foram obtidos por Nassar mostraram utilidades econômicas (Nassar, 2010), como valores altos de proteína (Nassar & Costa, 1978; Nassar & Dorea, 1982; Nassar, 2007), resistência a seca (Nassar, 1978d; Nassar, 2001),

resistência a doenças (Nassar, 1978a ,b,c) fonte de carotenóides (Nassar, 2007), e apomixia (Nassar et al., 1998; Nassar, 2005). Havia também certa possibilidade de que os tipos poliplóides pudessem adquirir natureza apomítica, que não se manifestava no indivíduo diplóide.

Essas hipóteses nos despertaram interesse para examinar tipos diplóides e poliplóides para verificar a existência de multiembriões.

Sabendo-se que há espécies em que o multiembrionismo apenas se manifesta após ocorrer polinização, e também aquelas em que o endosperma desenvolve-se autonomamente, buscamos identificar qual processo está presente em *Manihot*.

A viabilidade polínica é importante para a compreensão dos resultados obtidos, portanto utilizamos dois métodos diferentes para medir-la.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A apomixia é o desenvolvimento de sementes sem a união do núcleo espermático do pólen com a oosfera (Bashaw, 1980). O embrião se desenvolve a partir de células somáticas ou da oosfera não reduzida, tendo exatamente a mesma constituição da planta mãe. A manutenção do genótipo é conveniente agrônômica e evolutivamente, possibilitando a propagação de cultivares de alto potencial; a fixação de genes de adaptação, sem perdas genéticas e sem acúmulo de contaminação. Além disso, evita a erosão genética, isto é, o desaparecimento total de um gene por meio de segregação genética (Nassar, 2001, 2009).

A apomixia está presente em cerca de 15% das famílias das angiospermas. Setenta e cinco por cento das espécies apomíticas estão nas famílias Poaceae, Asteraceae e Rosaceae. O primeiro relato sobre o que hoje se denomina apomixia foi em 1841, quando uma planta feminina de *Alchornea* (Euphorbiaceae) cultivada isoladamente no Jardim Botânico de Kew, em Londres, formou sementes, o que se explica somente pela presença de apomixia (Dall'agnol E Schifino-Wittmann, 2005).

A maioria das angiospermas se reproduz sexualmente. Produzem gametas advindos da meiose, e a fusão desses gametas gera um novo indivíduo, com um novo genótipo, a partir do desenvolvimento do embrião. Na formação dos gametas das plantas superiores o resultado final é um pólen com dois núcleos, e um saco embrionário com oito núcleos; sendo denominados antípodas (três); núcleos polares (dois); oosfera (um); e sinérgides (duas) (Tucker & Koltunow, 2009).

Nas flores masculinas são formados quatro micrósporos ( $n$ ) após duas meioses. A formação do pólen decorre de duas divisões mitóticas nos micrósporos. A primeira divisão produz um tubo nuclear e um núcleo generativo. A segunda divisão ocorre apenas nesse núcleo, formando duas células espermáticas. Quando o pólen germina pelo estigma, seus núcleos podem chegar ao saco embrionário. Um desses núcleos se fundirá aos núcleos polares formando o endosperma ( $3n$ ), e o outro se fundirá com a oosfera e dará origem ao embrião. (Singh, 2002). Na *M. esculenta* o estigma é receptivo durante 24 horas após a antese da flor feminina. E o período entre a polinização e a fertilização pode variar entre 8 e 19 horas (Chandraratna & Nanayakkana 1948).

Na divisão gamética feminina (megagametogênese) ocorrem duas meioses a partir da célula mãe do megásporo, que formam quatro células (n), três degeneram e apenas um megásporo normalmente sobrevive. Em seguida, para a formação do óvulo, há três divisões mitóticas. Na primeira divisão, um núcleo do megásporo se divide dando origem à micrópila primária e ao núcleo calazal primário. A segunda divisão forma dois núcleos em cada extremidade. Por fim a terceira resulta em quatro núcleos em cada pólo. Um núcleo de cada pólo migra para a região central do saco embrionário, e passam a ser chamados núcleos polares. Um dos três núcleos que se situam na região micropilar se diferencia gerando a célula ovo, enquanto as outras duas serão denominadas sinérgidas. As outras três na extremidade calazal são as antípodas. Para cada núcleo ocorre formação de parede celular, a não ser para os núcleos polares que recebem uma mesma parede. Esse conjunto forma o saco embrionário (Yang et al., 2010).

Durante a polinização, e fertilização nas plantas superiores, os grãos de pólen caem no estigma. O tubo polínico cresce até a micrópila, e entra na nucela. Os dois núcleos espermáticos são liberados no saco embrionário. Um núcleo se une à oosfera para dar origem a um zigoto  $2n$  (embrião). O outro se funde com o núcleo secundário para formar o endosperma triplóide. A partir desta dupla fecundação, uma semente se desenvolve (Singh, 2002).

Porém nem sempre a formação dos gametas e a dupla fertilização ocorrem normalmente. A formação de sementes que não passam por esses processos podem seguir outras rotas de desenvolvimento, como por exemplo, as vias apomíticas de reprodução assexual. Há dois tipos principais de apomixia, segundo Asker & Jerling (1992), que estão descritos a seguir.

Na **apomixia gametofítica** há formação de um saco embrionário não reduzido (diplóide), por dois caminhos diferentes: diplosporia ou aposporia. Nestes sacos embrionários não reduzidos, haverá desenvolvimento do embrião a partir da oosfera ou, mais raramente, a partir das sinérgidas ou antípodas. O endosperma pode desenvolver-se também autonomamente, ou seja somente a partir dos núcleos polares, ou pela união de um núcleo masculino com os núcleos polares (pseudogamia). Em apomíticos pseudogâmicos há, portanto, necessidade de polinização, mas apenas para a formação do endosperma (Schallau et al., 2010).

Na outra forma de apomixia, a **apomixia esporófitica**, também chamada de embrionia adventícia, comum em espécies de *Citrus* e *Mangifera*, não há formação de sacos embrionários, mas os embriões diplóides desenvolvem-se diretamente a partir de células da nucela ou tegumentos do óvulo (Asker & Jerling, 1992).

Apesar de anteriormente considerada como um “beco sem saída” evolutivo, as recentes descobertas sobre a variabilidade genética, e herança em apomíticos, indicam um grande potencial deste modo de reprodução para o melhoramento genético de plantas. A apomixia é uma característica com considerável plasticidade gênica, podendo haver vários graus de expressão em uma mesma espécie. (Ozias-Akins, 2006)

O endosperma também pode desenvolver-se autonomamente, ou seja, somente a partir dos núcleos polares. Por outro lado, há o desenvolvimento por pseudogamia, que é a união de um núcleo espermático do pólen com os núcleos polares sem a fecundação da oosfera. Em apomíticos pseudogâmicos há, portanto, necessidade de polinização, mas apenas para a formação do endosperma. Deve-se levar em consideração também que tanto apomixia como anfimixia pode ocorrer no mesmo indivíduo. Algumas plantas apomíticas não desenvolvem sementes sem que haja polinização, sendo obrigatoriamente pseugâmicas. Já outras plantas desenvolvem multiembriões sem que haja polinização (Nogler, 1984).

A apomixia está freqüentemente associada com alta esterilidade de pólen (Grant, 1981). Essa esterilidade está relacionada com a má formação dos gametas originada principalmente pela aneuploidia (Stebbins 1971). A aneuploidia ocorre quando não há o pareamento devido das cromátides, acarretando em má formação de quiasma e conseqüente segregação irregular dos cromossomos. Os indivíduos oriundos desses gametas terão número cromossômico anormal (ex:  $2n+1$ ;  $2n-1$ ;  $2n+2$ ; entre outros). Carvalho et al. (2009) observaram pareamento irregular em muitas variedades de *M. esculenta*. O cruzamento interespecífico também pode ser uma causa da má formação de gametas, pois os cromossomos não homólogos, que diferenciam as espécies, não se pareiam, resultando em univalentes e aneuploidia. Nesses casos a apomixia serviria de escape para a manutenção da espécie, propagando genótipos vantajosos (Richards, 1997). Isto é, aqueles indivíduos que possuem genes de apomixia poderão ser perpetuados e salvos e aqueles que não possuem morrem e serão extintos da população por não gerar gametas viáveis.

A apomixia em *M. esculenta* foi relatada pela primeira vez por Nassar em 1979. Estudos posteriores apontaram que se tratava de apomixia apospórica (Nassar, 1995; Nassar et al., 1998; Nassar et al., 2000; Nassar, 2001; Nassar, 2003). Características uniformes na morfologia das progênies de híbridos interespecíficos e o uso de genes marcadores em cruzamentos controlados foram os primeiros indícios de apomixia encontrados por Nassar (1995). A partir daí, outras análises mais criteriosas, como análise anatômica do óvulo, devem ser feitas (Nassar, 2001).

Atualmente a propagação comercial da *M. esculenta* é realizada vegetativamente. Apesar de garantir a heterose por ser uma clonagem, apresenta limitações fitossanitárias, pois a cada ciclo as estacas utilizadas encontram-se mais contaminadas devido ao acúmulo de patógenos, limitando a exploração da produtividade da *M. esculenta* (Nassar, 2006).

Nesse contexto, a introdução de apomixia na *M. esculenta* pode ser uma alternativa para o problema por garantir a manutenção de certa variedade, e por possibilitar a utilização de uma semente limpa, desprovida de patógenos. Como citado anteriormente.

A natureza genética da apomixia foi estudada por alguns autores (Ramulu et al., 1999; Ozias-Akins, 2006; Asker & Jerling, 1992; Rodrigues & Koltunow, 2005), mas ainda não é uma característica completamente controlada (Dall'agnol & Schifino-Wittmann, 2005). Mas sabe-se que a maioria das plantas apomíticas é poliplóide (Asker & Jerling, 1992). Uma das dificuldades encontradas é a plasticidade dessa característica, e em cada espécie a apomixia pode se expressar de forma diferente. Por isso é importante que se investigue exaustivamente a apomixia em todas as espécies em que se encontra.

Em *Paspalum notatum*, foi verificado que os resultados de análise de apomixia nas progênies eram mais bem explicadas por um modelo modificado de herança tetrassômica de apenas um gene dominante com efeito pleiotrópico e penetrância incompleta (Martínez et al., 2001). Isso é importante no estudo de apomixia para *M. esculenta*, pois a natureza aloploplóide em *Manihot* é documentada como um fenômeno natural (Sardos et al., 2009), o que pode estar relacionado com o aparecimento de apomixia na espécie.

A poliploidia, que é a presença de mais de dois conjuntos cromossômicos no mesmo núcleo (Soltis & Soltis, 2000), é considerada um fenômeno comum no reino vegetal e reconhecida como um importante processo para a geração da diversidade genética (Grant, 1981; Otto & Whitton, 2000; Adams & Wendel, 2005; Soltis et al. 2009).

Organismos poliplóides podem surgir por duplicação cromossômica de células somáticas ou por gametas não reduzidos produzidos a partir de falhas na meiose durante a esporogênese (Wet, 1971); entretanto, a formação de gametas não reduzidos parece ser o fator predominante (Levin, 2002). E um dado relevante nesse estudo é o de que mais de 70% das fanerógamas são poliplóides (Moore, 2002).

Tradicionalmente, os poliplóides são classificados como autopoliplóides quando surgem da autopolinização ou cruzamento entre indivíduos da mesma espécie; e alopoliplóides quando surgem da hibridação interespecífica, como no caso do trigo (Soltis, 2005; Otto, 2007; Sardos et al., 2009; Chantret et al., 2005).

Nos alopoliplóides, a reprodução assexuada é fundamental para a permanência inicial dos híbridos na natureza já que os híbridos interespecíficos geralmente apresentam alta esterilidade, devido a problemas de pareamento cromossômico. Somente após a poliploidização a fertilidade lhes é restaurada (Stebbins, 1971).

O gênero *Manihot* pertence à família das Euphorbiáceas e inclui uma importante espécie agrícola, a *Manihot esculenta* Crantz (*M. esculenta*). O primeiro botânico a reconhecer e descrever o epíteto genérico *Manihot* foi Bauhin, em 1651. No entanto, apenas uma espécie era conhecida pelos botânicos, e posteriormente, em 1753, Linneu a classificou dentro gênero *Jatropha* e a designou *Jatropha Manihot*. A primeira publicação pós Linneu, com maior conhecimento do gênero, foi de Crantz que então descreveu a espécie *Manihot esculenta*. (Rogers & Appan, 1973).

Em 1973 Rogers & Appan publicaram a monografia mais completa do gênero descrevendo 98 espécies, dentre as quais apenas a *Manihot esculenta* Crantz é cultivada comercialmente em função de suas raízes ricas em carboidratos. Quanto à origem do gênero, tanto Rogers & Appan quanto outros pesquisadores acreditam que se encontra no continente Americano (Nassar, 1978b).

O Gênero *Manihot* é encontrado ao longo do continente Americano, desde a latitude 30°S a 30°N, e até 1800m de altitude, e abrange 98 espécies, das quais apenas a *Manihot esculenta* foi domesticada (Rogers & Appan, 1973).

Embora haja poucas evidências arqueológicas devido às dificuldades de conservação de fósseis em ambientes tropicais (Pereira, 1989), estudos e coletas de Nassar (1978a, 2000) indicam quatro centros de diversidade para a *M. esculenta*, sendo que o maior está situado no Centro-Oeste Brasileiro (Sul de Goiás e Oeste de Minas Gerais.).

Alem de *M. esculenta*, interessa-nos duas espécies que contribuíram na formação dos híbridos estudados nesta tese, que são *Manihot Glaziovii* Muell. Arg. e *M. anomala* Pohl. O material escolhido para o presente trabalho indica ser fonte potencial de genes de apomixia Nassar (2001).

O melhoramento genético, por meio de cruzamentos interespecíficos, pode desenvolver variedades que atinjam o máximo potencial da cultura. A principal dificuldade em se obter um híbrido interespecífico é a barreira interespecífica. Porém ela pode ser quebrada, tornando possível transferir as características desejadas (Soltis & Soltis, 2009).

Qualidades como produtividade alta; resistência a doenças; tolerâncias à seca e apomixia podem ser transferidas de espécies silvestres para cultivares de *M. esculenta* pelo cruzamento interespecífico.

A *M. esculenta* possui  $2n=36$  cromossomos, e apresenta meiose regular com 18 bivalentes (Graner, 1935; Perry, 1943; Nassar, 1978). Tem origem alotetraplóide segmental, tendo como número básico  $x = 9$  (Umanah & Hartmann, 1973).

A compatibilidade genética entre as espécies cruzadas é importante para o sucesso na transferência de genes de interesse. O principal método utilizado na verificação da compatibilidade é a análise dos cromossomos em anáfase. No cruzamento entre *Manihot esculenta* e *Manihot glaziovii* foi observada baixa compatibilidade genética (Nassar, 2001). O híbrido obtido desse cruzamento tem características importantes como resistência ao mosaico da *M. esculenta*; tolerância à seca; resistência à bacteriose; e apomixia (Nassar, 2003).

### 3. OBJETIVOS

- Detectar multiembionismo.
- Verificar associação entre multiembionismo e poliploidia.
- Verificar se há relação entre polinização e poliembrião.
- Comparar dois métodos de viabilidade de pólen.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Biologia da UnB, localizada na latitude 15° 44'19'' e longitude 47°52'50'' e altitude de 1015m acima do nível do mar, em Brasília, DF. O clima regional é semi-árido, tendo umidade relativa média anual de 45% e temperaturas médias máxima e mínima registrada de 37°C e 2°C respectivamente; e precipitação média anual de 1.552.1mm.

### 4.2 DESCRIÇÃO DO MATERIAL ESTUDADO

O material estudado conta de uma cultivar de *M. esculenta* proveniente do híbrido de *M. glaziovii* e *M. esculenta*, que não expressou apomixia. Esse deu origem a uma progênie que apresentou segregação genética em relação a vários fatores, como produção de raízes tuberosas. Destas foram selecionadas aquelas que apresentavam boa produção de raízes, entre as quais se destaca a cultivar 307-2 (Nassar, 1992). Já que na espécie *M. glaziovii* foi observada apomixia, e por ser uma característica herdável, genes de apomixia estarão presentes nestas plantas (Ozias-Akins, 2006).

Para melhor compreensão do material estudado, segue a descrição morfológica da cultivar 307-2:

Hábito arbustivo com altura entre 1,5 e 2 metros, ramificado, semi-ereto (Fig. 1.A), caule com 5- 9 cm de diâmetro, com látex. Caules jovens e maduros glabros, caules jovens verdes acinzentados, geralmente ramificando-se em três ramos. Folhas membráceas, alternas, palmadas, simples ou com três ou cinco lobos ovóides com ápice agudo (Fig. 1.D), margens inteiras a levemente onduladas, com nervuras actinódroma e inserção do pecíolo basal, face adaxial verde brilhante, face abaxial levemente clara, estípulas filiforme caducas com até 1cm, nós e cicatrizes das folhas proeminentes. Inflorescência em panícula terminal, muito ramificada com 2 flores femininas na base da inflorescência (Fig. 1.B). Flores pistiladas cônicas amareladas pigmentadas de roxo, com 5 tépalas levemente intumescidas, ovário trilocular, uniovulado com estigma séssil, com estames rudimentares e disco laranja. Flores estaminadas esféricas verdes amareladas com pigmentos roxos, com 10 estames em 2 verticilos e

discos vermelhos. Brácteas e bractéolas filiforme caducas. Frutos esféricos com pequena asa pigmentada de roxo, e ápice deslocado lateralmente, pedúnculo verde (Fig. 1.C).

Além desta cultivar, foram usados ainda dois híbridos interespecíficos de *M. esculenta* com espécies silvestres. Esses híbridos foram poliploidizados artificialmente por meio de aplicação de colchicina nos botões laterais, e posteriormente multiplicados por propagação vegetativa de suas estacas.

A espécie *M. glaziovii* Muell. Arg. pertence à seção *Glaziovianae*, em que se encontram espécies de hábito arbóreo; com mais de 5 metros de altura; estípulas persistentes; inflorescência em racemo ou panícula; pecíolo peltado ou basal. Foi levada para os continentes Africano e Asiático com o intuito de servir como fonte de extração de látex. Em alguns países adaptou-se ao ponto de confundir-se com a vegetação nativa (Rogers & Appan, 1973).

Quanto à *M. anomala* Pohl., é uma espécie da seção *Sinuatae*, e é a única espécie da seção com folhas inteiras ou levemente panduratas. Arbustos de no máximo 3,0 m de altura, muito ramificado. Raízes tuberosas com alargamentos intermitentes, com látex leitoso e odor de ácido cianídrico (HCN); epiderme amarelada, áspera marrom claro ao marrom escuro, castanho claro subepidérmicas, córtex com uma consistência aquosa. Quando jovem pode ser glabro ou pubescente; hastes maduras lenhosas com medula pequeno, glabro ou pubescente. Folhas alternas, folhas jovens e gemas de cor verde-amarelo forte e estípulas caducas, filiformes, glabras ou pubescentes; pecíolos com 10,0 centímetros de comprimento, glabro ou pubescente, verde-amarelado ou vermelho escuro; incisão na lâmina basal do pecíolo não peltada. A variabilidade nos fenótipos desta espécie indica um conjunto de genes altamente heterozigotos (Rogers & Appan, 1973).

Segue a descrição do Híbrido poliplóide entre *M. esculenta* e *M. glaziovii* :

Hábito arbóreo com altura entre 2,5 e 3,5 metros, ramificado, tronco com 10-15 cm de diâmetro (Fig. 2.B), com látex. Caules jovens e maduros glabros, caules jovens verdes acinzentados. Folhas coriáceas,

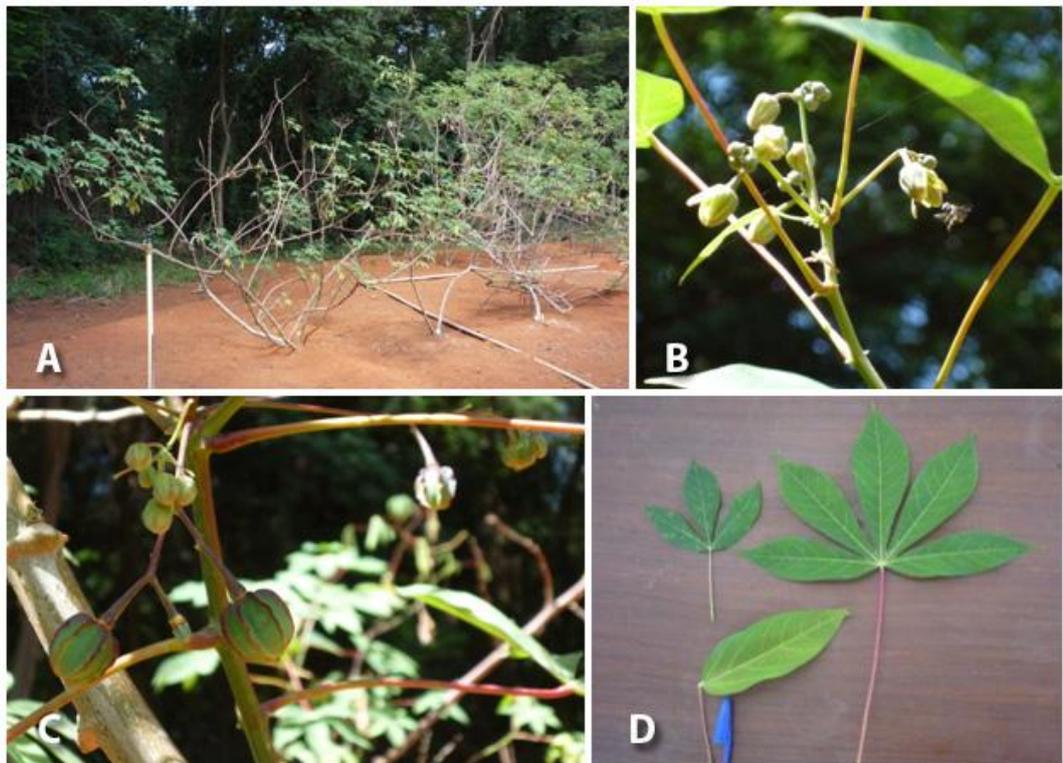
alternas, palmadas, predominantemente simples ou com três lobos; às vezes cinco lobos ovóides com ápice agudo (Fig. 2.D), margens inteiras a onduladas, com nervuras actinódroma e inserção do pecíolo basal, face adaxial verde brilhante, face abaxial levemente clara, estípulas filiforme caducas com até 2cm, nós e cicatrizes das folhas pouco proeminentes. Inflorescência em panícula terminal, pouco ramificada com 2 flores femininas na base da inflorescência . Flores pistiladas cônicas amareladas a verde, com 5 tépalas intumescidas, ovário trilocular, uniovulado com estigma séssil, com estames rudimentares, às vezes com 10 estames com pólen, e disco vermelho. Flores estaminadas cônicas verdes amareladas com pigmentos roxos, com 10 estames em 2 verticilos e discos vermelhos, e às vezes com ovário rudimentar. Brácteas e bractéolas filiforme caducas. Frutos esféricos, sem asa, e ápice deslocado lateralmente, pedúnculo verde (Fig. 2.C). Pecíolo de folhas e inflorescências longo, com cerca de 12cm.

Por fim, a descrição do terceiro material trabalhado: Híbrido poliplóide entre *M. esculenta* e *M. anomala*:

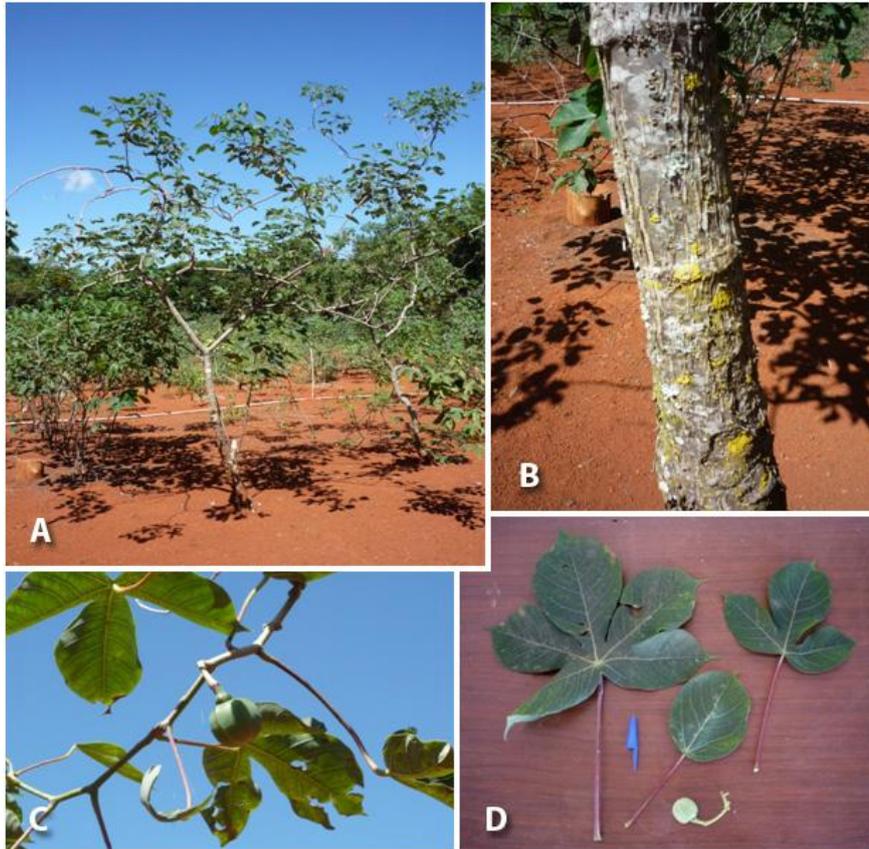
Hábito arbustivo com altura entre 0,5 e 1 metros, ramificado, procumbente (Fig. 3.A), tronco com 5 - 8 cm de diâmetro, com látex. Caules jovens glabros, e maduros pilosos durante a floração, caules jovens verdes acinzentados (Fig. 3.B), geralmente ramificando-se em três ramos. Folhas coriáceas, alternas, palmadas, predominantemente simples ou com três lobos, em menor quantidade cinco lobos ovóides com ápice agudo (Fig. 3.C); margens inteiras a levemente onduladas; com nervuras actinódromas e inserção do pecíolo basal; face adaxial verde; face abaxial levemente clara e com maior pilosidade, estípulas filiforme caducas com até 1cm, nós e cicatrizes das folhas pequenas. Inflorescência em panícula terminal, muito ramificada com 2 flores femininas na base da inflorescência. Flores pistiladas pilosas; cônicas amareladas pigmentadas de roxo; com 5 tépalas bastante intumescidas; ovário trilocular, uniovulado com estigma séssil; com estames rudimentares ou com 10 estames em alguns casos; e disco laranja. Flores estaminadas pilosas; esféricas verdes amareladas com pigmentos roxos; com 10 estames em 2 verticilos e discos vermelhos.

Brácteas e bractéolas filiformes caducas. Frutos esféricos sem asa, pedúnculo verde a amarelo.

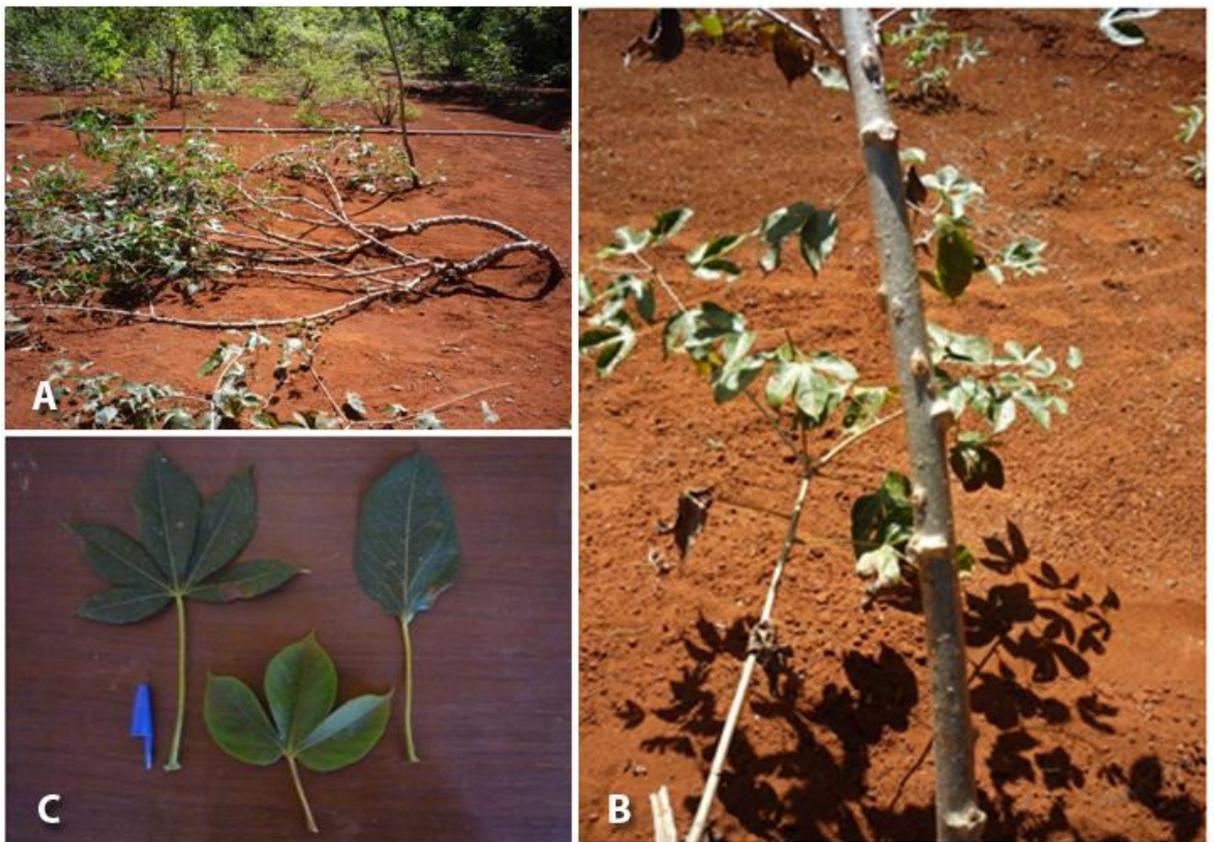
Foram usadas cinco plantas representativas destas variedades como fonte de matéria para estudo.



**Fig. 1. A- Aspecto geral da planta 307-2. B- Inflorescência com flores recém pós-anteses e um polinizador. C- Fruto mostrando asas pequenas e pigmentadas. D- Folhas simples com três a cinco lobos.**



**Fig. 2.** A- Aspecto geral do híbrido poliplóide *M. glaziovii* x *M. esculenta*. B- Caule lenhoso. C- Fruto sem asas. D- Folhas simples com três a cinco lobos.



**Fig. 3. A- Aspecto geral do híbrido poliplóide *M. anomala* x *M. esculenta*. B- Caule com citatrizes muito proeminentes. C- Folhas simples com três a cinco lobos.**

### **4.3 ANÁLISES DE APOMIXIA**

O reconhecimento botânico da apomixia pode ser feito pelo estudo anatômico dos óvulos, onde se busca observar formação de multiembriões no tegumento, na nucela, ou no saco embrionário (Nassar et al., 2006, 2007, 2008).

Para estudar possível influência da polinização e do estágio de desenvolvimento da flor na presença de óvulos poliembriônicos, foram coletadas flores em diferentes tamanhos, sendo que os tamanhos dos ovários eram de 3mm; 4mm; 5mm; 6mm; 7mm; e 8mm, e com diferentes tratamentos: pré-antese; pós-antese e pós-antese protegidas com plástico PVC e fita adesiva (Fig.4) .

Essas flores foram fixadas por 24 horas em líquido de Carnoy (álcool e ácido acético glacial na proporção 3:1). Em seguida, utilizou-se a técnica de clearing (Herr, 1982), que consiste em:

Medida do ovário e remoção dos óvulos sob lupa; desidratação em série etanólica (70, 80, 90 e 100%), durante uma hora em cada solução; tratamento com benzil benzoato quatro e meio (BB 4 ½ ) que é composto de : ácido láctico, cloro hidratado, fenol, óleo de cravo, xileno e benzil benzoato nas proporções 2:2:2:2:1:1 (v/v) durante 24 horas, para clarificação dos óvulos. Seguido de embebição dos óvulos em solução de metil salicilato (100%) e BB 4 ½ na proporção 1:1 v/v; para se obter maior contraste durante a confecção das lâminas (Ogburia & Adachi 1994). Observação dos óvulos íntegros e clarificados ao microscópio óptico Olympus BX 50. As imagens foram captadas pelo software HonestechTVR 2.5.

Foram analisados 303 óvulos de flores antes da antese da planta 307-2; 206 do híbrido poliplóide de *M. glaziovii*; e 236 do híbrido poliplóide de *M. anomala*; 52 óvulos de flor protegida da planta 307-2; 43 do híbrido poliplóide de *M. glaziovii*; e 91 do híbrido poliplóide de *M. anomala*; e 241 óvulos de flor pós-antese da planta 307-2; 236 do híbrido poliplóide de *M. glaziovii*; e 207 do híbrido poliplóide de *M. anomala*. Totalizando no final do trabalho 1.613 óvulos.

Os óvulos que apresentaram saco embrionário com 2 embriões foram classificados como apomíticos e os que revelaram somente o saco embrionário vazio ou apenas um embrião foram classificados como óvulos normais. Havendo dois sacos embrionários, esse óvulo também foi considerado apomítico, pois foi considerado um saco sexual e outro de origem apomítica. Caso tenha sido encontrado embrião fora do saco embrionário, ou seja, na nucela ou em tegumento, também foi considerado apomítico. O óvulo foi considerado atrofiado quando nenhum saco embrionário foi encontrado. Esta técnica permite a visualização *in totum* do saco embrionário, podendo verificar-se anormalidades no desenvolvimento do embrião.

Foi calculada a porcentagem de apomixia para posterior comparação entre as plantas e entre os tratamentos. Essa porcentagem calculada para cada material estudado adveio da razão entre óvulos apomíticos e total de óvulos analisados x 100.

#### **4.4 ANÁLISE MEIÓTICA**

A observação das configurações cromossômicas de uma espécie é uma importante ferramenta para o estudo da apomixia. Há evidência de que a apomixia está associada com irregularidades no pareamento cromossômico (Sousa, 2001).

A formação de bivalentes é freqüentemente usada para indicar o grau de parentesco entre as espécies hibridizadas, e reflete a probabilidade de transferência de genes entre elas. O pareamento completo, a homologia dos cromossomos e a formação de quiasmas servem para manter os dois cromossomos em um bivalente (Stebbins, 1971).

Com a finalidade de se estudar o comportamento cromossômico meiótico, foi analisado 15 células em metáfase de cada planta para verificar as configurações cromossômicas da célula mãe do micrósporo.

Após a coleta das flores masculinas (às 8 horas da manhã), foi feita a fixação dos botões florais com fixador de Carnoy, feito com álcool e ácido acético na proporção de 3:1(V/V). As amostras permanecem imersas na solução fixadora durante 24 horas. Em seguida faz-se a lavagem do material com água destilada em abundância para retirada de resíduos entre um tratamento e outro. A conservação desse material foi feita em álcool 70% sob refrigeração.

As lâminas foram preparadas segundo a técnica de Swaminathan et al.(1954), esmagando-se as anteras retiradas dos botões florais. As anteras esmagadas com bastão de vidro são coradas com acetocarmina a 1%. As partes maiores de tecido vegetal foram retiradas com pinça. O material foi coberto com lamínula e comprimido com o dedo polegar após ser submetido a uma lavagem com duas gotas de ácido acético 45% para promover melhor contraste entre citoplasma e material genético. Para preservar as lâminas por mais tempo, foi adicionada uma gota de solução de ácido acético 45% e glicerina 10% (Fenny Dane & Tsuchiya, 1979). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, modelos Olympus BX 50 e Zeiss Axioskop MC 80. As imagens foram digitalizadas através de captação de imagens com o software HonestechTVR 2.5, com a câmera fotográfica Opton West Germany acoplado ao microscópio MC 80. A contagem dos cromossomos foi feita em seguida.

#### **4.5 ANÁLISE POLÍNICA**

Para avaliar as taxas de viabilidade de pólen nas plantas estudadas foram usados dois métodos (Fig. 5). Em ambos foram coletadas cerca de 40 flores masculinas de cada progênie em pré-antese. Na determinação do índice de viabilidade, considera-se uma quantidade de no mínimo 1.000 polens analisados. A fixação e a conservação são feitas da mesma forma que para a caracterização cromossômica.

As lâminas são preparadas esmagando-se as anteras com uma leve pressão, o suficiente para que sejam liberados os grãos de pólen; aplicação do corante; e análise ao microscópio óptico, semelhante ao utilizado na análise cromossômica.

O primeiro método consiste em corar as anteras com carmina em ácido acético (Swaminathan *et al.* 1954). O material é coberto com lamínula e observado em microscópio óptico, com aumento de 20X (fig. 5.B). O grão de pólen que se apresentar de forma circular, grande e corado homogeneamente, num tom vermelho intenso, é considerado viável; enquanto que aquele irregular, pequeno ou com coloração heterogênea (amarelo-claro), é considerado inviável. Após contagem dos grãos de pólen, a porcentagem de viáveis e inviáveis calculada pela razão entre os grãos viáveis e o total de grãos contados na lâmina.

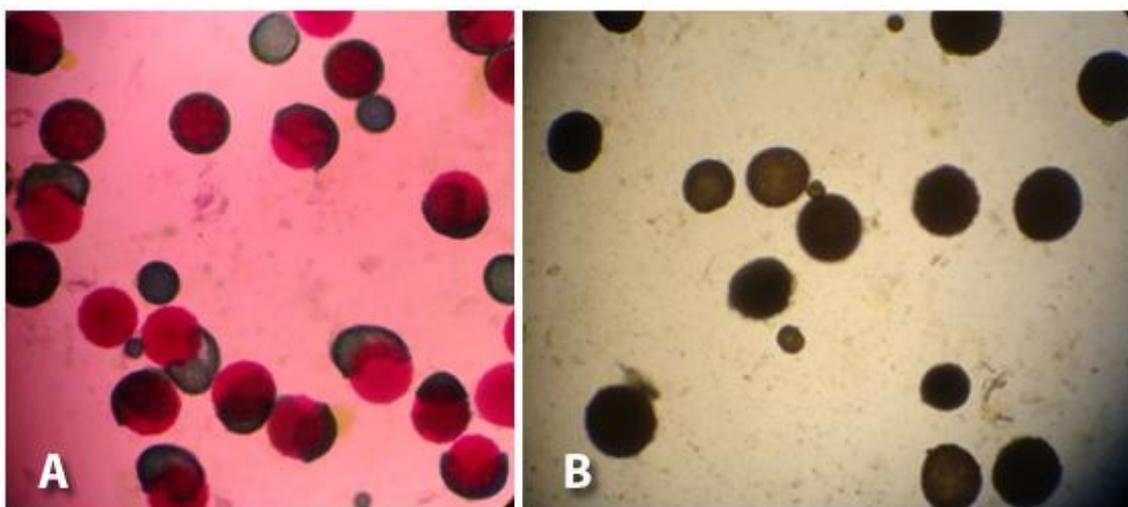
O segundo método consiste em utilização da solução de Alexander, que é composto pela adição dos seguintes reagentes na seguinte ordem: 10 ml de álcool 95%; 5 g de hidrato de cloro; 50mg fuchsin ácido (5ml de uma solução de 1% em água); 5 mg de laranja C (0,5ml de uma solução de 1% em água); e 1-4 ml de ácido acético glacial (Alexander 1969). Para esse método é feita a hidratação dos botões gradativamente, deixando-se 30 minutos em álcool 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, e por fim em água destilada.

Após a montagem, as lâminas são levadas à estufa e ficam em repouso por 24h a 50°C. Os polens inviáveis apresentam nas cores verde a azul, e o viável na cor vermelho claro a vermelho escuro (fig. 5.A) dependendo da concentração de ácido acético adicionado. Neste caso também será feita a relação entre polens viáveis e totais entre os contados para encontrar a viabilidade de pólen.

A comparação estatística entre os dois métodos foi feita pela aplicação do teste do  $\chi^2$  para verificar se há diferenças significativas.



**Fig. 4 – Proteção de flores antes da antese.**



**Fig. 5.A – Pólens corados com corante de Alexander. B – Pólens corados por acetocarmina.**

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 APOMIXIA DA CULTIVAR 307-2

As plantas estudadas tiveram diferentes épocas de florescimento. Tanto o híbrido poliplóide entre *M. esculenta* e *M. glaziovii*, como o híbrido poliplóide entre *M. esculenta* e *M. anomala* tiveram um curto período de produção de flores entre dezembro e abril. Já o acesso 307-2 teve sua floração iniciada em novembro, que durou também até abril.

Durante o estudo sobre formação de multiembrionismo nas plantas selecionadas, foram analisados ao todo 596 óvulos da cultivar 307-2; sendo 303 de flores antes da antese; 52 de flores protegidas; e 241 de flores pós-anteses sem proteção.

Ao analisar os óvulos já clarificados, pôde-se perceber o desenvolvimento de uma estrutura entre o tegumento interno e o tegumento externo do óvulo, essa foi contabilizada como embrião tegumentar (Fig. 7a).

Além dos diferentes tratamentos de flor pós-antese, antes da antese e protegida, também foi levado em consideração o tamanho do ovário estudado, que variou entre 2 e 9 milímetros de altura. Para cultivar 307-2, foram encontrados óvulos apomíticos entre os tamanhos 3, 4, e 5mm principalmente do tipo adventício (Fig. 7a ); nos óvulos com 6 e 7mm não foram encontrados embriões (Fig.7b), e no tamanho 8 mm foram encontrados tanto embriões tegumentares quanto do tipo apospórico (Gráfico 1 A,B,C).

Essa constatação revela que, além da apomixia apospórica já citada por Nassar (2000), o gênero *Manihot* também pode apresentar apomixia adventícia. Há uma grande plasticidade no desenvolvimento dos tipos de apomixia, que podem coexistir em um mesmo indivíduo (Ozias-Akins, 2006).

Outro dado importante que a Tabela 1 nos traz é que houve óvulos multiembriônicos antes da antese. Na cultivar 307-2 o maior percentual de apomixia atingido (15%) foi em flores protegidas, seguido de flores antes da antese (14%), seguido por um índice bem menor nas flores pós-antese (8,7%).

Em parte, o alto índice de apomixia em flores protegidas pode estar associado ao número reduzido dessas. Isso ocorreu em função de grande número de flores abortadas em campo.

A principal hipótese relacionada ao alto índice de aborto é das flores terem interrompido o desenvolvimento devido à falta de polinização. Nesse caso mesmo que o óvulo apomítico desenvolva multiembriões independente de polinização pode haver a necessidade desta para que haja desenvolvimento da semente e do fruto. Para algumas espécies a polinização é indispensável para que o embrião adventício se desenvolva. Isso ocorre provavelmente porque esse embrião depende dos nutrientes fornecidos pelo endosperma sexual (Tucker & Koltunow, 2009).

No caso da planta 307-2, os óvulos encontrados como “atrofiados” podem ser relacionados à análise prematura dos óvulos (menores do que 3mm); onde o saco embrionário ainda não estaria formado por uma questão de tempo.

## **5.2 CITOGENÉTICA DA CULTIVAR 307-2**

Durante as análises meióticas de metáfase I, puderam ser observadas as configurações cromossômicas em metáfase. A cultivar 307-2 apresentou pareamento regular com 18 bivalentes (Fig. 6) em todas as metáfases.

O pareamento regular nessa cultivar indica que as incompatibilidades cromossômicas que ocorreram no híbrido interespecífico já foram superadas na geração F2.

Levando-se em consideração que o híbrido diplóide entre *M. esculenta* Crantz e *M. glaziovii* Muel. Arg. não apresentou óvulos multiembriônicos, o aparecimento de óvulos apomíticos nessa cultivar indica que a natureza genética de apomixia em *Manihot* é recessiva (Nassar, 2009), onde na primeira geração do híbrido não há segregação, mas pela segregação e formação de F2 há segregação, permitindo que genes recessivos se expressem. A outra hipótese é que a apomixia é derivada de ação poligênica com ação aditiva e isto pode estar expresso quando acontece segregação no F2 (Ozias-Akins, 2006).

## **5.3 VIABILIDADE POLÍNICA DA CULTIVAR 307-2**

Em relação aos métodos utilizados para medir a viabilidade de pólen, podemos dizer que a diferença de resultados entre os dois não foram significativas. Nota-se a

viabilidade polínica por Alexander (71.34%) e pelo método de Carmina (71,66%) em que o resultado de um confirma o do outro (Tabela 2).

Portanto, ao serem comparados os métodos, concluímos que o método que utiliza carmina é mais recomendado. Uma vez que o corante de Alexander necessita de vários componentes; leva mais tempo para ser elaborado; requer estufa; e um tempo mínimo de 24horas para confecção da lâmina; enquanto que o método com carmina exige menor investimento de recursos, além de gerar resultado imediato.

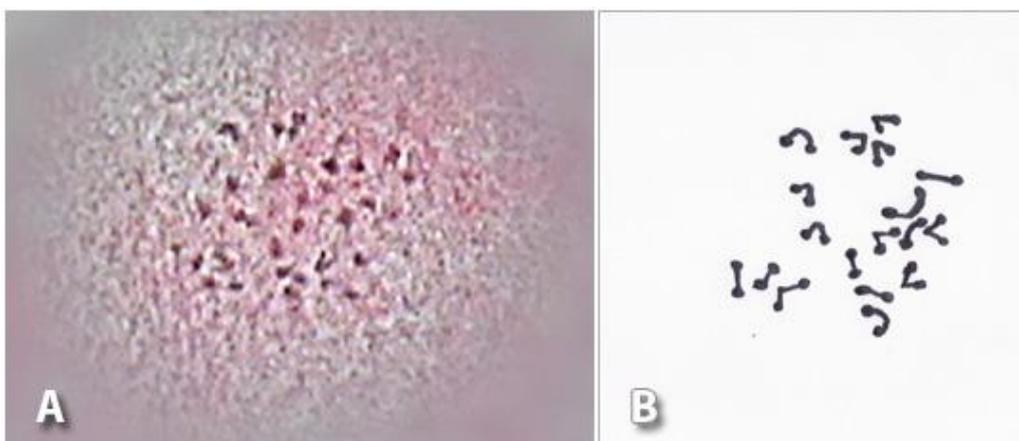


Fig. 6.A – Imagem no aumento de 60X de cromossomos da cultivar 307-2. B Ilustração representativa da disposição dos cromossomos na Fig.6.A.

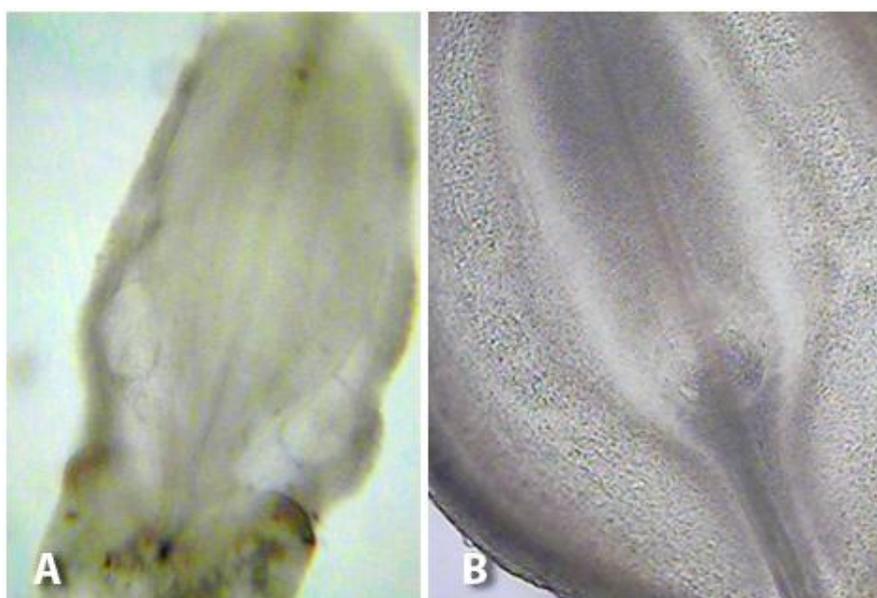


Fig. 7.A – Embriões tegumentares em flor antes da antese. B – óvulo normal da planta 307-2.

Tabela 1. Número de óvulos estudados, de óvulos apomíticos encontrados e % de apomixia para diferentes tratamentos na cultivar 307-2.

	Total óvulos	de Total de apomíticos	de Total de atrofiados	de % de apomixia
Flor antes da antese	303	44	20	14%
Flor protegida	52	8	0	15%
Flor pós-antese	241	21	0	8,7%

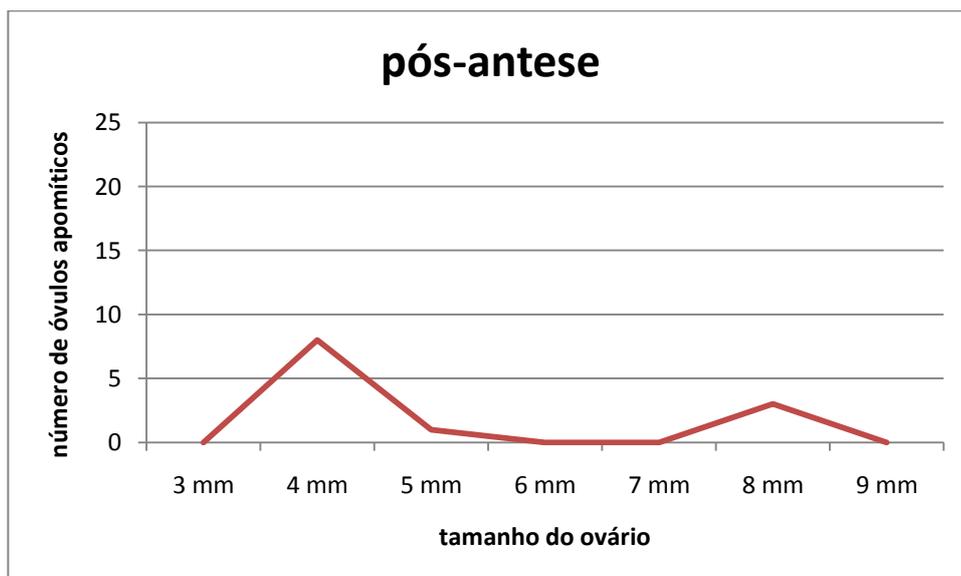
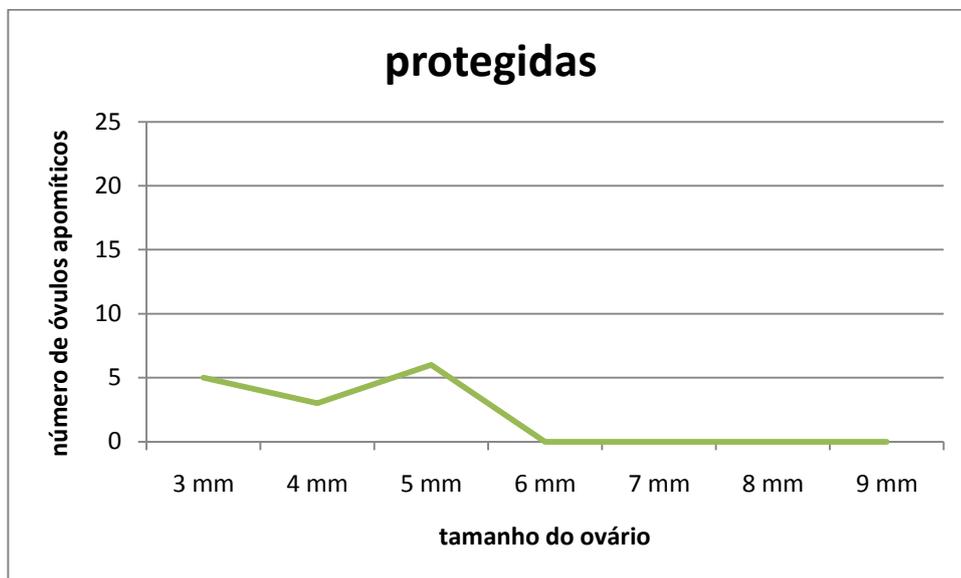


Gráfico 1A; B; C. Número de óvulos apomíticos nos diferentes tamanhos estudados para a cultivar 307-2.

Tabela2. Total de polens e % de viabilidade média encontrada com os dois métodos na cultivar 307-2

Planta: 307-2							
Corante: Carmina				Corante: Alexander			
Total	Viáveis	Inviáveis	Viabilidade	Total	Viáveis	Inviáveis	Viabilidade
301	220	81	73,09%	972	637	335	65,53%
436	347	89	79,59%	530	353	177	66,60%
404	269	135	66,58%	250	173	77	69,20%
337	227	110	67,36%	520	437	83	84,04%
<b>TOTAL</b>			<b>MÉDIA</b>	<b>TOTAL</b>			<b>MÉDIA</b>
1478	1063	415	71,66%	2272	1600	672	71,34%

#### 5.4 APOMIXIA DO HÍBRIDO POLIPLÓIDE *M. esculenta* x *M. glaziovii*

No estudo de apomixia relacionado ao híbrido entre *M. glaziovii* e *M. esculenta*, foram observados 485 óvulos, entre eles 206 óvulos foram de flores antes da antese; 43 óvulos de flores protegidas e 236 óvulos de flores pós-anteses (Tab. 3).

Durante as observações ao microscópio óptico para esse híbrido, foi encontrado um tipo único de óvulo multiembriônico, o qual parece apresentar dois sacos embrionários (Figs. 9 e 10). Ao que parece, um gene não expresso para apomixia estava presente ao nível diplóide, mas ao ocorrer a poliploidização a ação aditiva de genes responsáveis pela apomixia na *M. esculenta* pôde expressar-se.

Ao contrário de estudos que sugerem herança monogênica (Leblanc et al., 1995), esse dado pode indicar interação poligênica e ação aditiva de genes de apomixia em *Manihot*. Em algumas espécies de *Hieracium* a apomixia apresenta tipo de herança monogênica dominante, que pode ser transferido por gametas masculinos haplóides ou diplóides (Bicknell et al., 2000). Já em *Paspalum* foi relatado que mais de um par de genes eram necessários para que a apomixia se manifestasse (Fachinetti, 2010).

É evidente que trata-se de um tipo de herança de apomixia em *Manihot*, diferente do comportamento genético de apomixia no *Hieracium*.

Houve um considerável aumento entre o índice de multiembrionismo de flores antes da antese (5) e pós-antese (26). Mas observar que encontramos ocorrências antes da antese nos leva a acreditar que a polinização não é necessária para formação de multiembriões.

### **5.5 CITOGENÉTICA DO HÍBRIDO POLIPLÓIDE *M. esculenta* x *M. glaziovii***

Dentro de 15 metáfases analisadas foi notado média de formação de 3 quadrivalentes e 30 bivalentes (Fig.8). Não foram observadas quaisquer univalentes. Essas configurações cromossômicas e a falta de formação de univalente interpretam a alta viabilidade de pólen no estudo deste.

Os dados do presente trabalho indicam que a natureza genética de apomixia em *Manihot*, além de poder ser recessiva, pode também ser uma característica poligênica, em concordância com trabalhos anteriores (Nassar, 2009). Nesse caso, a apomixia não pode ser herdada por meio de gametas haplóide, e isso explicaria o fato do híbrido diplóide não apresentar poliembrião.

### **5.6 VIABILIDADE DE PÓLEN HÍBRIDO POLIPLÓIDE ENTRE *M. esculenta* x *M. glaziovii***

Usando métodos de Alexander e Carmina foi encontrado viabilidade de 73,69% para Carmina e 71,67% para Alexander (Tabela 4).

A viabilidade deste híbrido está de acordo com sua natureza poliplóide que permitiu o aumento de cromossomos não homólogos resultantes da hibridação. Mostra ainda a eficiência do corante Carmina, que combina simplicidade de preparo e da aplicação, sendo igual em resultado ao método de Alexander que é mais sofisticado no preparo e na aplicação.

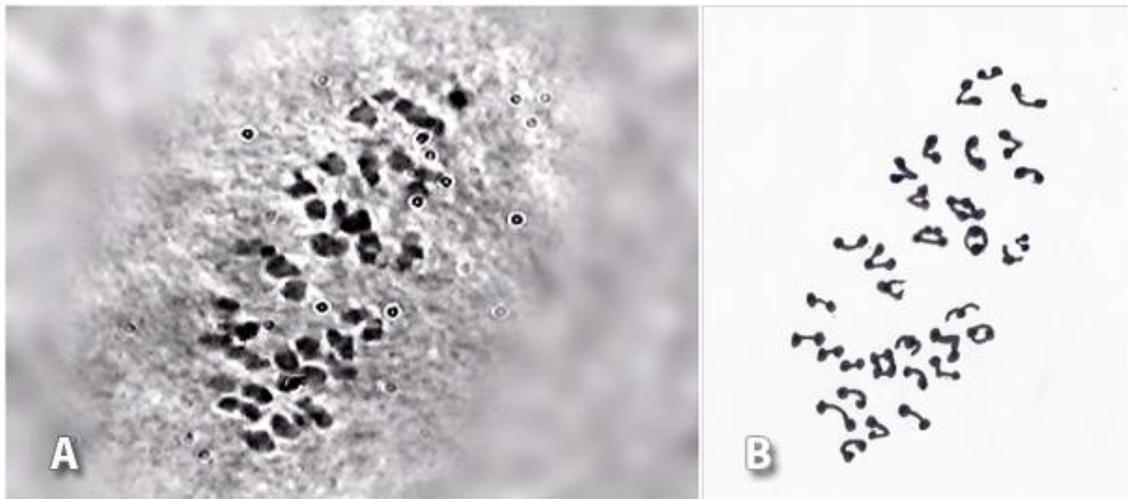


Fig. 8.A – Imagem no aumento de 100X de cromossomos do híbrido entre *M. esculenta* e *M. glaziovii*.  
B – Ilustração explicativa dos cromossomos em “A”.

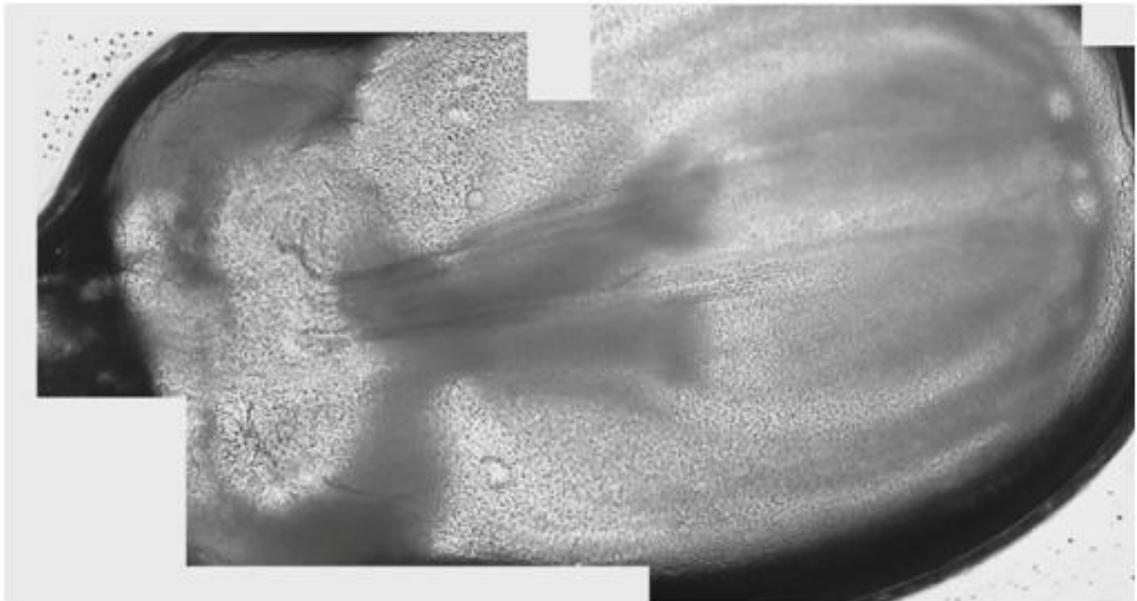


Fig. 9 – Óvulo com dois sacos embrionários.

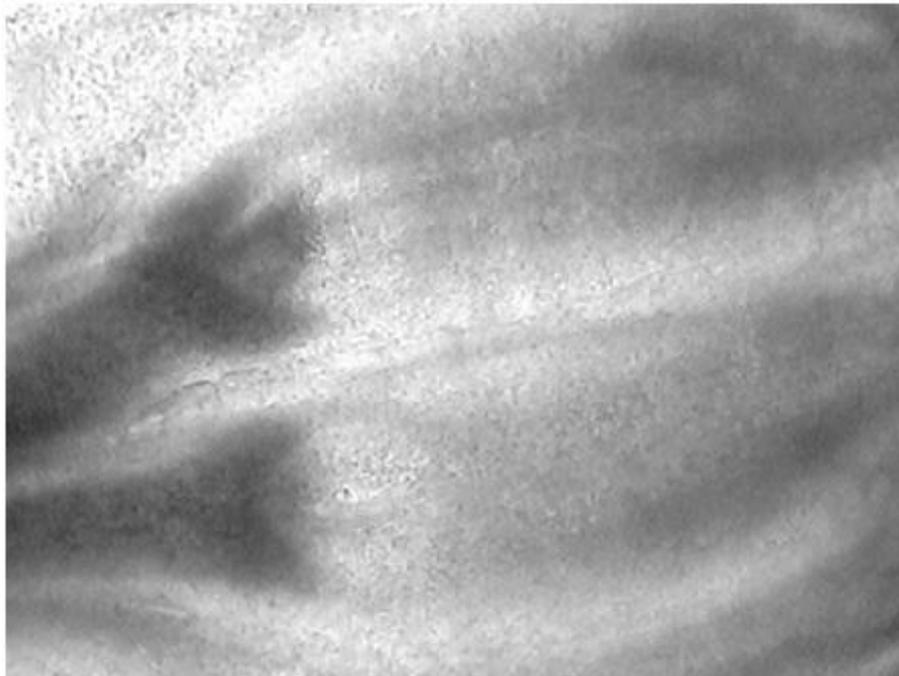
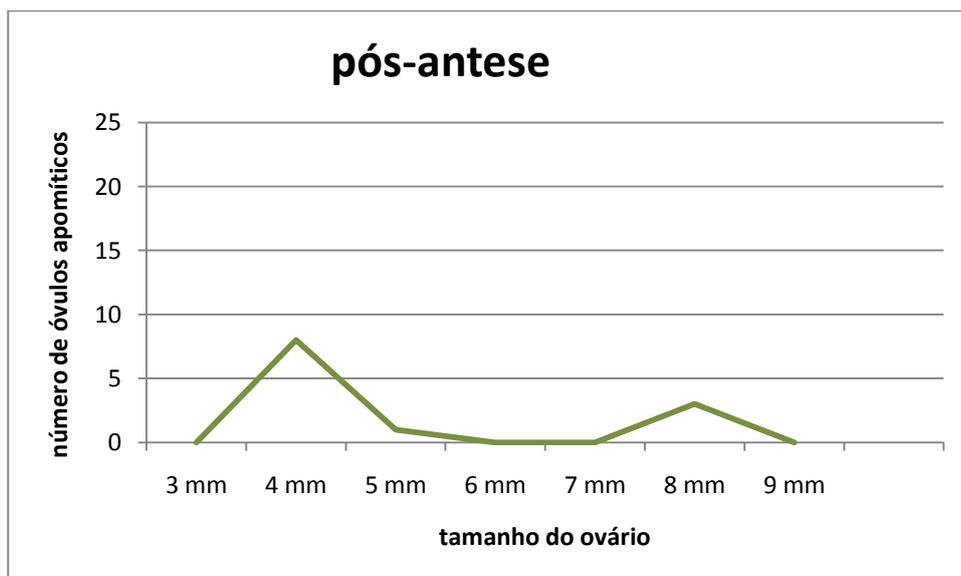
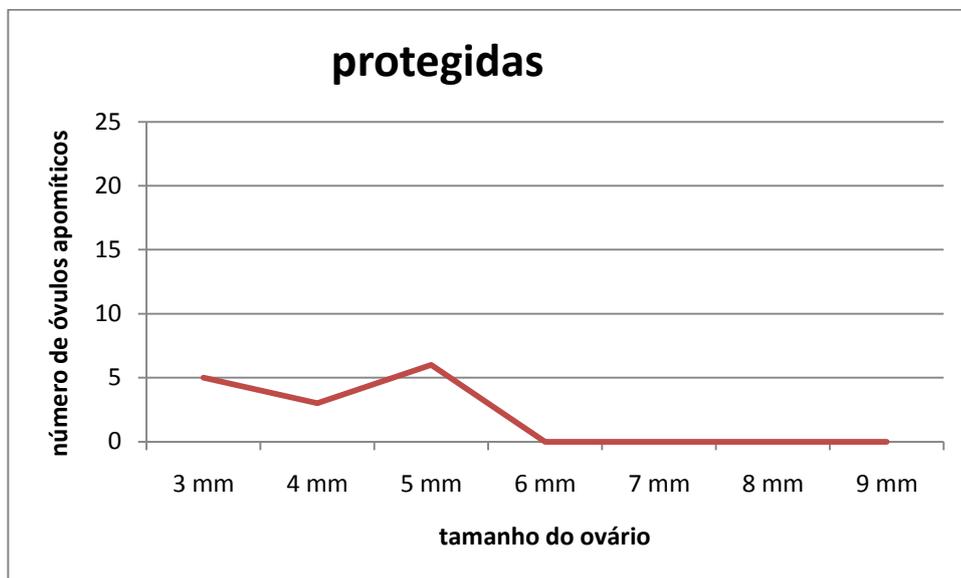


Fig. 10 – Detalhe dos sacos embrionários em Fig.10.

Tab 3. Número de óvulos estudados, de óvulos apomíticos encontrados e % de apomixia para diferentes tratamentos no híbrido poliploide com *M. glaziovii*.

	Total óvulos	de Total apomíticos	de Total atrofiados	de Total de % de apomixia
Flor antes da antese	206	5	21	2,4%
Flor protegida	43	11	-	25%
Flor pós- antese	236	26	16	11%



Gráficos 2 A; B; C. Número de óvulos apomíticos nos diferentes tamanhos estudados para o híbrido poliplóide *M. glaziovii* X *M. esculenta*

Tabela 4. Total de polens e % de viabilidade média encontrada para os dois métodos no híbrido poliplóide entre *M. esculenta* e *M. glaziovii*

Planta: Híbrido poliplóide com <i>M. glaziovii</i>							
Corante: Carmina				Corante: Alexander			
Total	Viáveis	Inviáveis	Viabilidade	Total	Viáveis	Inviáveis	Viabilidade
408	282	126	69,12%	479	304	175	63,47%
630	493	137	78,25%	447	357	95	79,87%
0				662	487	179	73,56%
<b>TOTAL</b>			<b>MÉDIA</b>	<b>TOTAL</b>			<b>MÉDIA</b>
1038	775	263	73,69%	926	661	270	71,67%

### 5.7 APOMIXIA DO HÍBRIDO POLIPLÓIDE ENTRE *M. ESCULENTA* E *M. ANOMALA*

As plantas poliplóides do híbrido entre *M. anomala* e *M. esculenta* apresentaram alto índice de flores hermafroditas (cerca de 80%). Os polens retirados dessas flores mostraram viabilidade igual a das flores estaminadas, o que pode ter levado à cleistogamia (autofecundação antes da antese).

As flores no gênero *Manihot* são normalmente unissexuais e a planta monóica. A ocorrência de ambos os sexos na mesma flor pode ter ocorrido em decorrência da hibridação interespecífica, e da poliploidização, que interferem por vários modos, diretamente na expressão gênica (Soltis & Soltis, 2009). A explicação ao certo desse fenômeno fica como sugestão para futuros estudos.

O exame de multiembrionismo no híbrido poliplóide entre *M. anomala* e *M. esculenta* foi feito a partir de 534 óvulos (Tab. 5). Sendo que destes 236 para flores antes da antese; 91 para flores protegidas; e 207 para flores pós-anteses.

Essa porcentagem 4,8% corresponde a porcentagem zero encontrada quando foi examinada mesma planta no nível diplóide (Nassar et al, 2005).Esses resultados confirmam o que foi encontrado por Nassar e que o surgimento de apomixia nesse híbrido foi associado a poliembrionia.

Isso nos conduz a acreditar que neste híbrido, semelhante ao que foi encontrado no híbrido *M. Glaziovii* x *M. esculenta* poliplóide, a apomixia pode ser atribuído a presença de múltiplos alelos e que esses alelos atuam associando-se numa maneira aditiva.

Há ainda o fato do baixo teor apomítico neste tipo poliplóide comparado ao híbrido poliplóide *M. glaziovii* x *M. esculenta*. Isto pode ser devido a estrutura genética de progenitores e à ação aditiva de tipo de apomixia na *M. esculenta* (Nassar, 2006).

Os óvulos poliembriônicos foram encontrados entre os tamanhos de 3 e 5 mm, sendo que 4mm foi o de maior incidência (Fig. 14).

Os tratamentos de flor antes da antese e flor pós-antese tiveram índices semelhantes de apomixia.

## **5.8 CITOGENÉTICA DO HÍBRIDO POLIPLÓIDE ENTRE *M. ESCULENTA* E *M. ANOMALA***

O híbrido poliplóide entre *M. esculenta* e *M. glaziovii* apresentou 72 cromossomos nas 15 células analisadas em Meiose I, sendo que 4 univalentes; 28 bivalentes (Fig. 11). Isso pode confirmar o sucesso da poliploidização realizada anteriormente.

## **5.9 VIABILIDADE DE PÓLEN HÍBRIDO POLIPLÓIDE ENTRE *M. esculenta* X *M. anomala***

Usando o método de Alexander e Carmina na avaliação de viabilidade de pólen do híbrido poliplóide entre *M. esculenta* x *M. anomala*, notou-se porcentagem de viabilidade de 79% no uso de carmina comparado a 52,33% pelo uso do método de Alexander (Tab. 6)

Há evidência que o resultado de carmina é correspondente ao comportamento cromossômico e sua segregação. O fato de ter média alta de formação de frutos (52) coletados por planta indicam alta fertilidade apoiaram a hipótese de que a carmina é o

método mais confiável para avaliar viabilidade de pólen, além de sua simplicidade no preparo.

Alem disso, a falta de formação de univalentes, que normalmente é responsável pela irregularidade na segregação cromossômica meiótica e formação de gametas desequilibrados e aborto no pólen também sustenta a hipótese de alta viabilidade polínica.



Fig. 11. A- Imagem no aumento de 100X de cromossomos da cultivar *M. anomala*. B - Ilustração representativa da disposição dos cromossomos na Fig.10a.

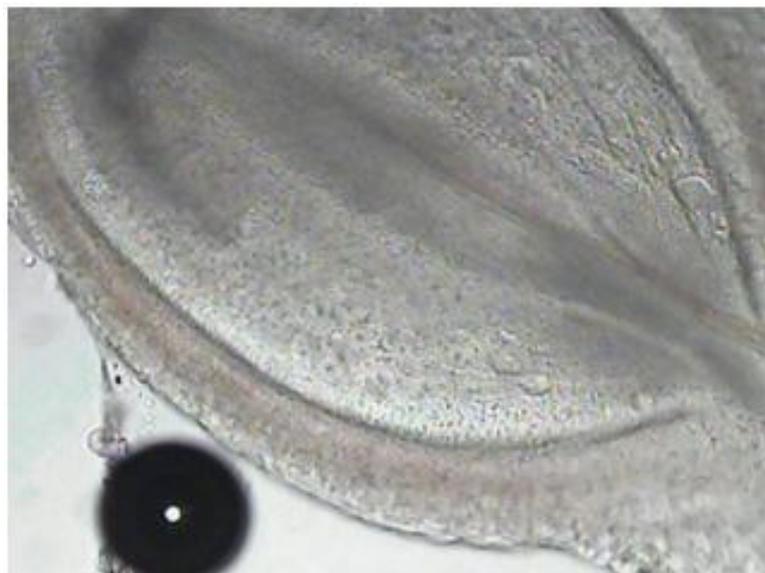


Fig. 12- Óvulo normal.



Figura 13 - Embrião tegumentar.

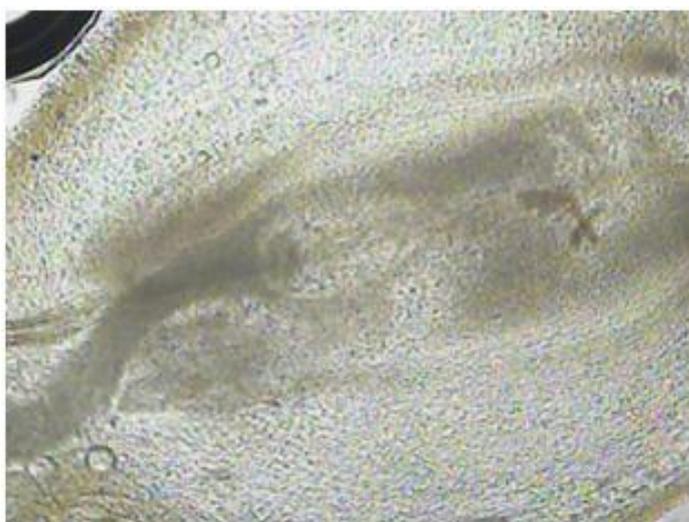
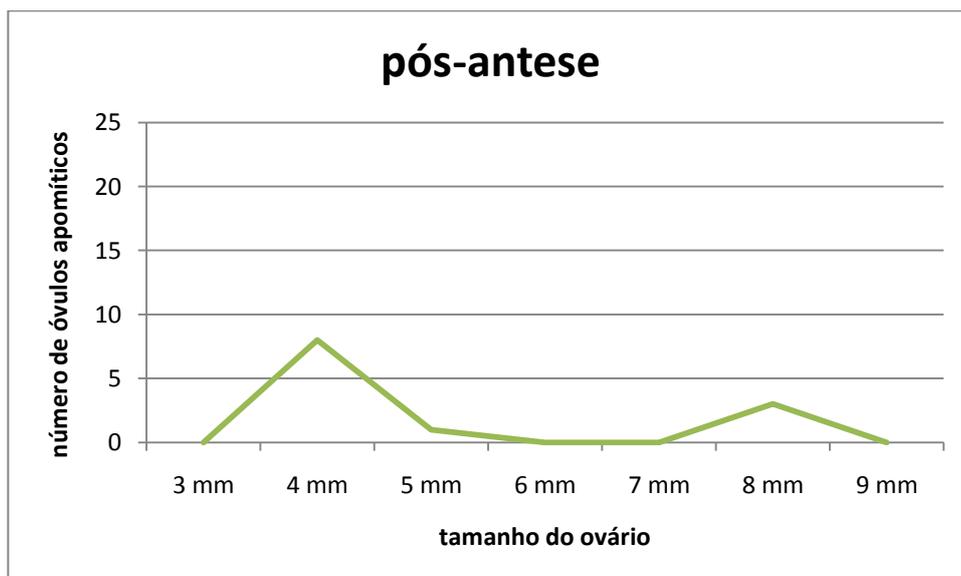
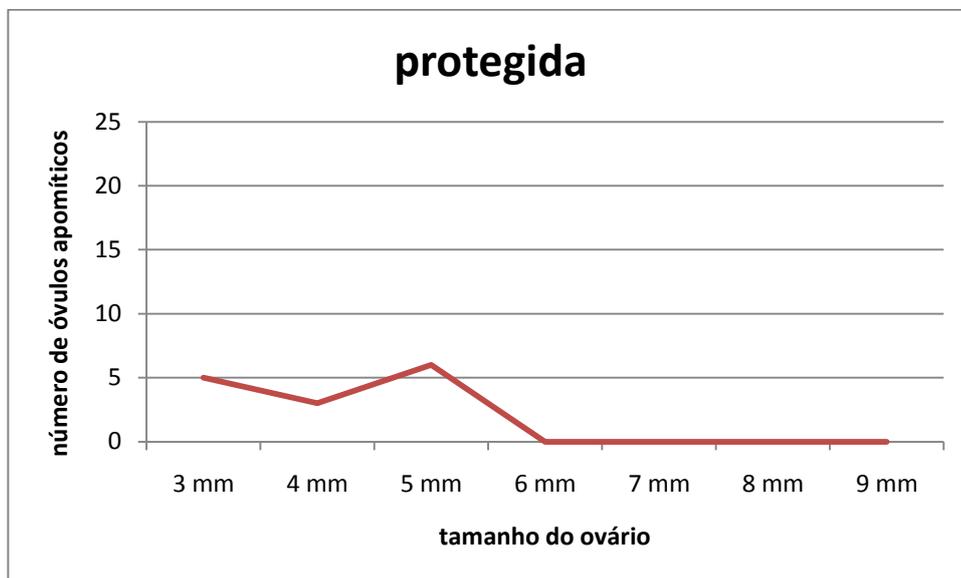


Figura 14 - Óvulo normal de flor pós-antese sem proteção.

Tabela 5. Número de óvulos estudados, de óvulos apomíticos encontrados e % de apomixia para diferentes tratamentos no híbrido poliploide com *M. anomala*.

	Total de óvulos	Total de apomíticos	Total de atrofiados	% de apomixia
Flor antes da antese	236	9	73	3,8%
Flor protegida	91	2	11	2,1%
Flor pós-antese	207	10	15	4,8%



Gráficos 3 A; B; C. Número de óvulos apomíticos nos diferentes tamanhos estudados para o híbrido poliplóide *M. anomala* X *M. esculenta*.

Tabela 6. Total de polens e % de viabilidade média encontrada para os dois métodos no híbrido poliplóide entre *M. esculenta* e *M. anomala*.

<b>Planta: Híbrido poliplóide anomala x esculenta</b>							
<b>Corante: Carmina</b>				<b>Corante: Alexander</b>			
<b>Total</b>	<b>Viáveis</b>	<b>Inviáveis</b>	<b>Viabilidade</b>	<b>Total</b>	<b>Viáveis</b>	<b>Inviáveis</b>	<b>Viabilidade</b>
401	308	93	77,00%	816	375	441	46,00%
395	246	149	75,00%	887	538	349	60,00%
404	277	127	86,00%	1104	564	543	51,00%
<b>TOTAL</b>			<b>MÉDIA</b>	<b>TOTAL</b>			<b>MÉDIA</b>
1200	831	369	79,33%	2807	1477	1333	52,33%

## 5.10 DISCUSSÃO ENTRE OS TRÊS MATERIAIS

Houve um alto índice de aborto de flores protegidas nos três genótipos, o que se deve à falta da polinização. Isso implicou em uma elevação relativa dos índices de apomixia desse tratamento (Tab. 7).

Entre os materiais estudados o híbrido poliplóide *M. esculenta* x *M. anomala* foi o que apresentou menor índice apomítico para os tratamentos de flor protegida e flor aberta. Sendo a planta 307-2 também proveniente de *M. glaziovii*, pode-se dizer que a espécie *M. glaziovii* tem mais alelos relacionados a multiembrinismo que a espécie *M. anomala*, e portanto os genótipos provenientes da *M. glaziovii* irão apresentar maior índice apomítico em geral.

Com relação à viabilidade de pólen, o teste de  $\chi^2$  demonstrou não haver diferenças significativas entre os dois métodos (carmina e Alexander) para as plantas 307-2 e híbrido poliplóide *M. esculenta* x *M. glaziovii*. No entanto houve diferença significativa entre os métodos quando testado para o híbrido poliplóide *M. esculenta* x *M. anomala*.

Tabela 8 . Méias de viabilidade de pólen para cada genótipo para dois corantes de pólen: Carmina e Alexander.

1. GENÓTIPO	Corante	Viabilidade	Média/ G	Média/C
307-2	Carmina	73.09	70.0983	Carmina 75.37
307-2	Alexander	67.11		
<i>M. esculenta x M. glaziovii</i>	Carmina	73.69	72.9933	Alexander 63.91
<i>M. esculenta x M. glaziovii</i>	Alexander	72.30		
<i>M. esculenta x M. anômala</i>	Carmina	79.33	65.8333	
<i>M. esculenta x M. anômala</i>	Alexander	52.33		

Tabela 9: Análise de variância e quadrados médios de dois tipos de corantes e suas medias em relação de os genótipos estudados.

1. FV	Quadrados médios		Genótipos	Média	
	Carmina	Alexander		Carmina	Alexander
Blocos	15.49	83.55	307-2	73.09 a	67.11 ab
Tratamentos	35.63 <sup>ns</sup>	321.98*	<i>M. esculenta x M. glaziovii</i>	73.69 a	72.30 a
Resíduo	41.00	19.39	<i>M. esculenta x M. anômala.</i>	79.33 a	52.33 b
Média	75.37	63.91			
CV(%)	8.5	6.89			

\*\* e\* significativos a 1 e 5% de probabilidade; respectivamente; pelo teste F ns não-significativo; pelo teste F

Tabela 7: índice de multiembrionismo para as três pantas.

	<b>307-2</b>	<b>Hib. poli. <i>M glaziovii</i></b>	<b>Hib. poli. <i>M anomala</i></b>
<b>Flor antes da antese</b>	14%	2,4%	3,8%
<b>Flor protegida</b>	15%	25%	2,1%
<b>Flor pós-antese</b>	8,7%	11%	4,8%

## 2. CONCLUSÃO

Dos nossos resultados conclui-se que há associação positiva entre poliploidia e apomixia em híbridos interespecíficos da *M. esculenta* com *M. glaziovii* e *M. anomala*.

Foi notado que o tipo da apomixia no *Manihot* não segue comportamento genético dos tipos encontrados em alguns gêneros como *Paspalum*.

O tipo de apomixia em *Manihot* ainda é diferente na sua natureza de outros tipos apomíticos sendo que combina natureza apospórica e adventícia na mesma planta.

Verificou-se que a formação de embriões múltiplos no óvulo das plantas apomíticas não depende da polinização e fertilização de um óvulo sexual.

Recomenda-se o uso do corante carmina como método seguro e muito simples do que usar método sofisticado de Alexander.

### 3. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, K.L. & WENDEL, J.F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, vol 8, p.135-141. 2005.

ALEXANDER, M.P. Differential Staining of Aborted and Nonaborted Pollen. **Stain Technology**, vol 44, p.117. 1969.

ASKER, S.E. & JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press. 1992.

BASHAW, E.C. Apomixis and its application in crop improvement. In: Hybridization of crop plants. **American Society of Agronomy and Crop Science Society of America**, p.45-63. 1980.

BICKNELL, R. A.; BORST, N. K.; & KOLTUNOW, A. M.. Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. **Heredity** vol 84, p.228–237. 2000.

CARVALHO, A.V.; VASCONCELOS, M.A.M.; SILVA, P.A.; ASCHERI, J.L.R. Produção de snacks de terceira geração por extrusão de misturas de farinhas de pupunha e *M. esculenta*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, 2009.

CHANDRARATNA, M.F. & NANAYAKKARA, K.D.S.S. Studies in cassava II – the production of hybrids. **Tropical Agriculturist**, vol 104, p.59-74. 1948.

CHANTRET, N.; SALSE, J.; SABOT, F.; RAHMAN, S.; BELLEC, A.; LAUBIN, B.; DUBOIS, I.; DOSSAT, C.; SOURDILLE, P.; JOUDRIER, P.; GAUTIER, M.F.; CATTOLICO, L.; BECKERT, M.; AUBOURG, S.; WEISSENBACH, J.; CABOCHE, M.; BERNARD, M.; LEROY, P. & CHALHOUB, B. Molecular Basis of Evolutionary Events That Shaped the *Hardness* Locus in Diploid and Polyploid Wheat Species (*Triticum* and *Aegilops*). **The Plant Cell**, vol 17, p.1033-1045. 2005.

DALL'AGNOL, M. & SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Apomixia, Genética e Melhoramento de Plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, vol 11, p. 127-133. 2005.

DE WET, J.M.J. Polyploidy and Evolution in Plants. **Taxon**, vol 20, p. 29-35. 1971.

FACHINETTO, J. M. **Caracterização agronômica, molecular, morfológica, e determinação do nível de ploidia em uma coleção de *Paspalum Totatum* Flüge** (Mestrado em zootecnia, área de concentração plantas forrageiras) – Universidade Federal de Santa Maria; 133p. 2010

FENNY DANE & TSUCHIYA, T. Meiotic chromosome and pollen morphological studies of polyploidy *Cucumis* species. **Euphytica** vol 28: p. 563-567. 1979.

GRANER, E.A. **Contribuição para o estudo citológico da *M. esculenta***. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 1935.

GRANT, V. **Plant Speciation**.. Columbia University Press, New York and London. 2nd ed. 1981.

HANNA, W.W. Use of apomixes in cultivar development. In: SAPRKS, D.L. **Advances in Agronomy**. New York: Academic Press, vol 56, p. 333-350. 1995.

HANNA, W.W. & BASHAW, E.C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, vol 27 p. 1136-1139. 1987.

HERR, J.M. An analysis of methods for permanently mounting ovules cleared in four-and-a-half type clearing fluids. **Stain Technology**, ed. 57 vol3 p. 161-169. 1982.

KOLTUNOW, A.M. & GROSSNIKLAUS, U. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review of Plant Biology**, vol 54, p. 547-574. 2003.

KOLTUNOW, A.M.; BICKNELL, R.A. & CHAUDHURY, A.M. Apomixis: Molecular Strategies for the Generation of Genetically Identical Seeds without Fertilization. **Plant Physiology**, ed.108 vol 4, p. 1345-1352. 1995.

LEBLANC, O.; GRIMANELLI, D.; GONZALEZ-DE-LEO, D.; SAVIDAN, Y. Detection of the apomictic mode of reproduction in maize- *ripsacum* hybrids using maize RFLP markers. **Theor Appl Genet** vol 90, p. 1198-1203.1995.

LEVIN, D.A. Polyploidy: Incidence, Types, and Modes of Establishment. *In*: Levin DA. **The role of chromosomal change in plant evolution**. Oxford University Press, Inc. p. 98-133. 2002.

MARTÍNEZ, E.J.; URBANI, M.H. & QUARIN, C.L. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. **Hereditas**, Lund, 135, p. 19-25. 2001.

MATZK, F.; MEISTER, A. & SCHUBERT, I. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. **The Plant Journal**, vol 21(1), p. 97-108. 2000.

MOORE, G. Meiosis in Allopolyploids – the Importance of `Teflon` Chromosomes. **Trends in Genetics**, vol 18, p. 456. 2002.

NASSAR, N. M. A.; N. BOMFIM; CHAIB, A. M. ; ABREU, L.F.A. & GOMES, P.T.C. Compatibility of interspecific *Manihot* crosses presaged by protein electrophoresis. **Genetics and Molecular Research**, vol9 (1) p. 107-112. 2010.

NASSAR, N.M.A.; GOMES,P.T.C.; CHAIB, A.M.; BOMFIM, N.N.; BATISTA, R.C.D.; & COLLEVATTI, R.G. Cytogenetic and molecular analysis of an apomictic cassava hybrid and its progeny. **Genetics and Molecular Reserch** vol8 (4) p. 1323-1330. 2009

NASSAR, N.M.A.; HASHIMOTO, D.Y.C. & FERNANDES, S.D.C. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research**, vol7(1) p. 16-28. 2008.

NASSAR, N. M. A.; KALKMANN, D.& COLLEVATTI, R. G. A further study of microsatellite on apomixis in cassava. **Hereditas**, vol 144 p. 01-04. 2007.

NASSAR, N.M.A. Cassava genetic resources and their utilization for breeding of the crop. **Genetics and Molecular Research**, vol 6 p.1151-1168. 2007.

Nassar, N.M.A.; Kalkmann, D.C.; & Collevatti, R. Molecular analysis of apomixis in cassava. . **Genetics and Molecular Research** vol5 (3): p. 487-492. 2006.

NASSAR, N.M.A. Chromosome doubling induces apomixis in a cassava x *Manihot anomala* hybrid. **Hereditas**, vol 143 p.01-03. 2006.

NASSAR, N.M.A & COLLEVATTI, R.G. Breeding cassava for apomixes. **Genetics and Molecular Research**, vol 4, p. 710-715. 2005.

NASSAR, N.M.A. & COLLEVATTI, R.G. Breeding cassava for apomixis. **Genetics and Molecular Research**, vol 4 p. 710-715. 2005.

NASSAR, N.M.A. Fertility and chimera induction in cassava interspecific hybrids. **Geneconserve**, vol1 (2): p. 117-123. 2003.

NASSAR, N.M.A. The nature of apomixis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Hereditas**, vol 134: p. 185-187. 2001.

NASSAR, N.M.A.; SANTOS, E. & DAVID, S.R.O. The transference of apomixis genes from *Manihot Neusana* Nassar to Cassava, *M. esculenta* Crantz. **Hereditas**, vol132, p. 167-170. 2000.

NASSAR, N.M.A.; VIEIRA, M.A.; VIEIRA, C. & GRATTAPAGLIA, D. Molecular and embryonic evidence of apomixis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, vol 102 p.9-13. 1998.

NASSAR, N.M.A.; VIEIRA, C. & GRATTAPAGLIA, D. Molecular and embryonic evidence of apomixis in cassava interspecific hybrids (*Manihot* spp.). **Canadian Journal of Plant Science**, vol78 p. 349-352. 1997.

NASSAR, N.M.A. Development and Selection for Apomixis. **Ciência e Cultura**, vol 46 p. 169-175. 1995.

NASSAR, N.M.A. Cassava in South America: A Plant Breeder'S View. **Ciência e Cultura**, 44 (1): 25-28. 1992.

NASSAR, N.M.A. & DOREA G. Protein contents of cassava cultivars and its hybrid with *Manihot* species. **Turrialba**, vol 32: p. 429-432. 1982.

NASSAR, N.M.A. Wild *Manihot* Species Of Central Brazil For Cassava Breeding. **Canadian Journal of Plant Science**, vol 58(2): p. 257-261. 1978a.

NASSAR, N.M.A. Conservation of the genetic resources of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): determination of wild species localities with emphasis on probable origin. **Economic Botany**, vol 32: p. 311-320. 1978b.

NASSAR, N.M.A. Some further species of *Manihot* with potential value to cassava breeding. **Canadian Journal of Plant Science**, vol 58: p. 915-919. 1978c.

NASSAR, N.M.A. Compatibility of cassava with four wild *Manihot* species from Central Brazil. **Turrialba**, vol 28: p. 92-94. 1978d.

NASSAR, N.M.A. & COSTA, C.P. Tuber formation and protein content in some wild cassava (*M. esculenta*) species native to central Brazil. **Experientia**, 33, p. 1304-1306. 1978e.

NOGLER, G.A. Gametophytic apomixis. In: *Embryology of Angiosperms* (Johri, B.M., ed.). **Springer Verlag, Berlin**, p. 475-518. 1984.

OGBURIA, M.N. & ADACHI, T. An improved cleared-pistil technique for rapid *in toto* observation of embryo sac malformation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz).

Cassava Biotechnology Network. **Second International Scientific Meeting**. Indonesia. 1994.

OTTO, S.P. & WHITTON, J. Polyploid Incidence and Evolution. **Annual Review of Genetics**, vol 34, p. 401-437. 2000.

OTTO, S.P. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. **Cell**, vol 131, p. 452-462. 2007.

OZIAS-AKINS, P.; Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, vol 25, p. 199-214. 2006.

PEREIRA, A.V. Utilização de análise multivariada na caracterização de germoplasma de *M. esculenta* (*Manihot esculenta* Crantz). Piracicaba, 1989. 180p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – USP/ESALQ. 1989.

PERRY, B.A. Chromosome Number and Phylogenetic Relationships in the Euphorbiaceae. **American Journal of Botany**, vol 30, p. 527-543. 1943.

RAMULU, K.S.; SHARMA, V.K.; NAUMOVA, T.N.; DIJKHUIS, P. & CAMPAGNE, M.M.L. Apomixis for Crop Improvement. **Protoplasma**, vol 208, p. 196-205. 1999.

RICHARDS, A.J. **Plant Breeding Systems (segunda edição)**. Chapman and Hall, Londres. 529pp. 1997.

RODRIGUES, J.C.M. & KOLTUNOW, A.M.G. Epigenetic aspects of sexual and asexual seed development. **Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica**. p: 37-49. Cracow, 2005.

ROGERS, D.J. & APPAN, S.; *Manihot, Manihotoides*. **Flora Neotropica**. New Yourk, Hafner Press. (monografia n° 13). 1973.

SARDOS, J.; RODIER-GOUD, M.; DAMBIER, D.; MALAPA, R.; NOYER, J.L. & LEBOT, V. Evidence for Spontaneous Polyploidization in Cassava *Manihot esculenta* Crantz. **Plant System Evolution**, vol 283, p. 203-209. 2009.

SCHALLAU, A.; ARZENTON, F.; JOHNSTON, A.J.; HAHNEL, U.; KOSZEGI, D.; BLATTNER, F.R.; ALTSCHMIED, L.; BARCACCIA, G. & BAUMLEIN, H. Identification and genetics analysis of the AOSPORY locus in *Hypericum perforatum* L. **The Plant Journal**, vol 62, p. 773-784. 2010.

SINGH, R. J. **Plant Cytogenetics**. CRC Press, Nova Iorque. 2002.

SOLTIS, P.S. Ancient and recent polyploidy in angiosperms. **New Phytologist**, vol 166, 5-8. 2005.

SOLTIS, P.S & SOLTIS, D.E. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, vol 97, p. 7051-7057. 2000.

SOLTIS, P.S & SOLTIS, D.E. The role of hybridization in plant speciation. **Annu. Rev. Plant Biology**, vol 60, p. 561-588. 2009.

SOLTIS, D.E.; ALBERT, V.A.; LEEBENS-MACK, J.; BELL, C.D.; PATERSON, A.H.; ZHENG, C.; SANKOFF, D.; dePAMPHILIS, C.W.; WALL P.K. & SOLTIS P.S. Polyploidy and angiosperm diversification. **American Journal of Botany** vol 96, p. 336-348. 2009.

SOUSA, E.S. Apomixia em *Manihot esculenta* e em seus híbridos interespecíficos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol 36, p. 9. 2001.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Addison-Wesley, London. 1971.

STEBBINS, G.L. Polyploidy, hybridization and the invasion of new habitats. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, vol 72, p. 824-832. 1985.

SWAMINATHAN, N.S.; MAGOON, M.L. & EARA, K.L.A. Simple propionocarmine PMC smear method for plants with small chromosomes. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, vol 14, p. 87-88. 1954.

TUCKER, M.R. & KOLTUNOW, A.M.G. Sexual and asexual (apomitic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. **Functional Plant Biology**, 36, p. 490-504. 2009.

UMANAHA, E.E. & HARTMANN, R. W. Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot* species. **Journal of American Society of Horticulture Science**, vol 98, p. 272-274. 1973.

YANG, W.C.; SHI, D.Q. & CHEN, Y.H. Female Gametophyte Development in Flowering Plants. **The Annual Review of Plant Biology**, vol 61, p. 89-108. 2010.