



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Botânica**

**Citoquimeras e poliploides totais em
Manihot esculenta (mandioca):
citogenética, anatomia e ontogenia do saco embrionário**

Danielle Yasmin Hashimoto Freitas

Brasília

2013



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Botânica**

**Citoquimeras e poliploides totais em
Manihot esculenta (mandioca):
citogenética, anatomia e ontogenia do saco embrionário**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Botânica.

Aluna: Danielle Yasmin Hashimoto Freitas

Orientador: Prof. Dr. Nagib Mohammed Abdalla Nassar

Brasília - DF

2013

Citoquimeras e poliploides totais em *Manihot esculenta* Crantz (mandioca):
citogenética, anatomia e ontogenia do saco embrionário.

Danielle Yasmin Hashimoto Freitas

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do Título de Doutora e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Banca Examinadora


Professor Doutor Nagib Nassar
Presidente


Professora Doutora Dalva Graciano Ribeiro
Membro Titular Interno


Professor Doutor Dario Grattapaglia
Membro Titular Externo - Embrapa


Professor Doutor Márcio Poças
Membro Titular Externo – CEL/UnB


Professor Doutor Paulo Kageyama
Membro Titular Externo – USP

Professora Doutora Silene Lozzi
Membro Suplente – GEM/UnB

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante...”

Antonie de Saint Exupéry

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida.

Sou eternamente grata aos meus pais, Hugo e Rozimeire, pelo tempo e todo esforço que dispenderam na minha educação e na minha formação como ser humano.

Ao estimado professor Nagib, pelos 10 anos de ensinamentos que ultrapassam qualquer tentativa de transcrição.

À professora Dalva Graciano Ribeiro, por todo carinho durante tantos anos.

À Dra. Anna Koltunow, Susan Johnson, Matt Tucker, Takashi Okada, Karsten Oester e Halley, pela amistosa recepção e prestatividade no período sanduíche do curso de doutorado realizado na Austrália.

Ao professor Augusto Franco e à professora Sueli Gomes, pelos preciosos ensinamentos ao longo do curso.

À professora Lourdes (em memória).

Aos estimados amigos Nayra Bomfim e Moises Mendoza, por tantas palavras de incentivo e perseverança; sou também grata pelo apoio e auxílio técnico dos colegas Carla, Emanuel, Fernanda, Isabela, Rayssa, Suzana.

Aos técnicos do laboratório de Anatomia, Daiane, Bernardo e Lucas; do laboratório de Biologia Celular, Ingrid, João e Mariana.

A toda a minha família, pelo apoio incondicional.

Ao marido Marcelo, pela paciência e companheirismo.

Ao filho amado Lucas, que trouxe sentido a tudo.

Aos irmãos Luciana e Mattheus pelo apoio.

À minha nova família, Jair, Jô, João Paulo, André e Neide, por estarem sempre presentes.

À querida tia Rosemarina pelo afeto maternal; ao Júlio, pelos momentos de distração.

À prima estimada Glaciela, sempre compartilhando alegrias e sofrimentos.

Meus sinceros agradecimentos a todos!

Índice

Figuras.....	vii
Tabelas.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
Introdução geral.....	1
Objetivos.....	3
Revisão bibliográfica.....	4
Citoquimeras e poliploides totais vegetais.....	4
Conceitos e aplicações.....	4
Citogenética de citoquimeras e poliploides.....	9
Biologia reprodutiva em angiospermas.....	11
Megagametogênese e megasporogênese em angiospermas.....	11
Apomixia em angiospermas.....	18
<i>Manihot esculenta</i>	23
Citogenética de <i>M. esculenta</i>	23
Biologia reprodutiva de <i>M. esculenta</i>	25
Referências bibliográficas.....	27
Capítulo 1.....	42
Apomixia na mandioca: avanços e desafios.....	43
Resumo.....	43
Abstract.....	44
Algumas considerações sobre a apomixia na mandioca.....	45
Frequência do gene da apomixia na mandioca.....	46
Tipos de apomixia na mandioca e sua transferência a partir de espécies silvestres.....	47

Transferência da apomixia a partir de <i>Manihot neusana</i> Nassar	48
Aumento da frequência apomítica através do melhoramento	50
Poliploidia, hibridização e apomixia na mandioca	51
Agradecimentos	52
Referências.....	52
Capítulo 2.....	56
Citogenética e comportamento anatômico de citoquimeras e poliploides totais em mandioca	57
Resumo	57
Abstract	58
Material e métodos	60
Resultados	64
Discussão.....	78
Agradecimentos	81
Referências.....	81
Capítulo 3.....	85
Ontogenia do saco embrionário de mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) com diferentes ploidias.....	86
Resumo	86
Abstract	87
Introdução	88
Material e métodos	88
Resultados	90
Discussão.....	96
Agradecimentos	99
Referências.....	99
Considerações finais.....	104

Figuras

Revisão bibliográfica

Figura 1. Cortes longitudinais de ápices meristemáticos caulinares mostrando diferentes tipos de citoquimeras vegetais.....	5
Figura 2. Meristema apical caulinar em vista longitudinal mostrando as camadas L1, L2 e L3, e a localização das células iniciais que dão origem a todo o corpo vegetal.....	6
Figura 3. Padrões de desenvolvimento do megagametófito exibido em angiospermas.....	13
Figura 4. Organização do saco embrionário em <i>Arabidopsis</i>	13
Figura 5. Padrões de divisão celular do zigoto em angiospermas.....	17
Figura 6. Esquema da formação do saco embrionário na reprodução sexual comparada à apomítica em três modalidades conhecidas: diplosporia, aposporia (apomixia gametofítica) e adventícia.....	19
Figura 7. Esquema de saco embrionário de <i>M. esculenta</i> com oito núcleos	26

Capítulo 1

Figura 1. Sacos embrionários apomíticos em <i>Manihot esculenta</i>	48
Figura 2. Sacos embrionários sexual e apospórico em <i>Manihot esculenta</i>	49
Figura 3. Sacos embrionários apospóricos em <i>Manihot esculenta</i>	50
Figura 4. Sacos embrionários apomíticos em híbridos poliploidizados de <i>Manihot glaziovii</i> x mandioca.....	51

Capítulo 2

Figura 1. Cortes longitudinais de meristemas apicais de tipos diploides, citoquimerais e poliploides totais de <i>Manihot esculenta</i>	65
Figura 2. Estômatos paracíticos em microscopia eletrônica de varredura nas faces abaxiais de tipos diploides, citoquimerais e poliploides totais de <i>Manihot esculenta</i>	67
Figura 3. Médias do comprimento e densidade estomáticos de tipos diploides, citoquimerais e poliploides totais de <i>Manihot esculenta</i>	67
Figura 4. Estágios de florescimento dos tipos diploides, citoquimerais e poliploides totais de <i>Manihot esculenta</i> ao longo de 50 meses de observação em campo.....	69
Figura 5. Ovários dissecados do híbrido entre <i>M. esculenta</i> e <i>M. glaziovii</i>	70

Figura 6. Taxa de óvulos/ovários (sementes imaturas) e sementes/frutos (sementes maduras) de tipos diploides, poliploides e quimerais de mandioca.....	70
Figura 7. Diâmetros de grãos de pólen de tipos diploides, citoquimeras, triploides e tetraploides de mandioca,.....	71
Figura 8. Médias das porcentagens de viabilidade de pólen de tipos diploides, poliploides totais e citoquimeras de mandioca, e seus respectivos diâmetros.....	72
Figura 9. Micrósporos nos tipos diploides, poliploides totais e citoquimerais de mandioca.....	72
Figura 10. Cromossomos em meiose e mitose de tipos diploides, poliploides totais e citoquimerais de mandioca.....	74
Figura 11. Saco embrionário sexual da cultivar diploide de mandioca.....	75
Figura 12. Saco poliembrionário de citoquimera de mandioca.....	75
Figura 13. Raízes comestíveis de tipos com ploidias distintas de mandioca.....	77

Capítulo 3

Figura 1 Flores femininas de <i>Manihot esculenta</i> em estágios sequenciais de desenvolvimento.....	89
Figura 2 Sacos embrionários clarificados dos tipos diploide e citoquimeral de mandioca.....	93
Figura 3 Sacos embrionários seccionados dos tipos diploide e citoquimeral de mandioca.....	94
Figura 4 Esquema do desenvolvimento do saco embrionário em <i>Manihot esculenta</i> nos tipos diploide e citoquimeral.....	95
Figura 5 Saco poliembrionário em tipo citoquimeral de mandioca.....	95

Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1. Médias de altura de ápices meristemáticos caulinares de tipos diploides e citoquimerais de mandioca.....	66
Tabela 2. Porcentagem de micrósporos nos tipos diploides, poliploides totais e citoquimerais de mandioca.....	73
Tabela 3. Número e porcentagem de sacos embrionários sexuais, poliembriônicos e abortados em óvulos de tipos diploides, poliploides totais e citoquimerais de mandioca.....	76
Tabela 4. Número e peso de raízes de cultivares de mandioca.....	77

Citoquimeras e poliploides totais em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): citogenética, anatomia e ontogenia do saco embrionário

(Hashimoto-Freitas, D. Y.; Doutorado em Botânica)

Resumo

A cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é a mais importante nos trópicos e subtropicais. Um das abordagens botânicas para seu melhoramento é a poliploidização. A introdução artificial de poliploidia pode gerar tanto poliploides totais quanto citoquimeras. Estudos citogenéticos e anatômicos nesses dois tipos foram realizados neste trabalho, com o intuito de caracterizar e selecionar indivíduos mais vantajosos para uso no melhoramento. Para tanto, ápices meristemáticos caulinares, grãos de pólen, óvulos, raízes, estômatos e períodos de florescimento foram analisados. A natureza citoquimeral foi comprovada pelo tamanho aumentado de estômatos e estruturas gaméticas, além do incremento na frequência de poliembriões. As associações e números cromossômicos obtidos em meiose indicaram a natureza tetraploide da camada subepidérmica da quimera. A formação da citoquimera foi acompanhada por total inibição de florescimento em um dos genótipos, e por aumento no tamanho de raízes quando comparado à planta diploide. A combinação de dados sobre viabilidade de pólen e tamanho do grão revelou-se como marcador confiável para se determinar a ploidia de indivíduos. O delineamento ontogenético do saco embrionário da mandioca nos tipos diploide e citoquimeral mostrou similaridades com o desenvolvimento do saco sexual do tipo *Polygonum*. A apomixia em mandioca parece necessitar de dosagens genéticas maiores que as fornecidas por citoquimeras para ser expressa.

Palavras-chave

Apomixia, citoquimera, epigenética, meiose, mitose, saco embrionário, proembrião.

Cytochimeras and total polyploids in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): cytogenetics, anatomy and embryo sac ontogeny

(Hashimoto-Freitas, D. Y.; PhD in Botany)

Abstract

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is the most important crop in tropics and subtropics. One botanic approach for its improvement is polyploidization. Artificial introduction of polyploidy can generate total polyploids or cytochimeras. Cytogenetics and anatomic studies on both types were conducted in this work, in order to characterize and select superior individuals for breeding use. Then, apical shoots, pollen grains, ovules, roots, stomata and flowering periods were analysed. Cytochimeral nature was proved by stomatal and gametic size increase, beside a rise in frequency of polyembryo sacs. Chromosomal associations and numbers obtained by meiosis indicated tetraploid nature of cytochimera sub epidermis layer. Cytochimera formation was accompanied by complete inhibition of flowering in one genotype, and increase in root size when compared to diploid plant. Pollen viability and grain diameter showed reliable markers to determine ploidy level in cassava individuals. Embryo sac ontogeny in diploid and chimeric type revealed similarities with *Polygonum* development of sexual sacs. Apomixis in cassava seems to need bigger genetic dosages than cytochimeras offer to be expressed.

Keywords

Apomixis, cytochimera, embryo sac, epigenetics, meiosis, mitosis, pro-embryo.

Introdução geral

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das 98 espécies compreendidas no gênero *Manihot* Mill. (Rogers e Appan, 1973). Este gênero tem como centro de origem e centros de variabilidade o Brasil e o México (Nassar, 1978; Nassar *et al.*, 2008). Ela é fonte de calorias para mais de 800 milhões de pessoas em todo o mundo (FAO, 2008), e todas as suas partes podem ser utilizadas economicamente, sendo as raízes o produto mais comumente consumido.

Tratamentos de poliploidização são utilizados para o melhoramento de culturas, em especial de mandioca (Nassar, 1999; Nassar e Ortiz, 2010), uma vez que a poliploidia está frequentemente relacionada ao aumento de resistência à seca, maior produtividade de raízes em espécies tuberosas, incremento no conteúdo proteico e nutricional, dentre outros (Hull-Sanders *et al.*, 2009). O uso de colchicina em gemas laterais com o intuito de poliploidização é uma técnica eficaz, mesmo acompanhada pela formação de quimeras setoriais e periclinais. Isto porque a colchicina pode não ter penetrância completa para chegar à L3 e formar poliploides totais. A penetrância parcial gera citoquimeras, sendo as mais estáveis as do tipo periclinal (Marcotrigiano e Gradziel, 1997).

Plantas citoquimerais periclinais de mandioca podem ser propagadas vegetativamente por estaquia, assim como cultivares comuns, sendo este um meio rápido de propagação que mantém a heterose. A contaminação de estacas por germes bacterianos e vírus é um dos problemas mais graves na produção da cultura. Por isso, a obtenção de sementes poderia resolver o problema; entretanto, ela traz a desvantagem da segregação sexual, que resulta em perda do vigor e da heterose. A apomixia apresenta-se como saída, pois fixa a estrutura genética e a heterose desejada em sementes clonais, evitando a segregação sexual (Koltunow *et al.*, 1995; Nassar, 2001, 2002). Na apomixia, as sementes se desenvolvem no ovário, como nas plantas de reprodução sexual, mas o embrião se forma sem a união do núcleo espermático do pólen com a oosfera (Bashaw, 1980).

A poliploidização da mandioca pode gerar várias vantagens, dentre elas arranjos genotípicos vantajosos para a produção de raízes, melhora nutricional e também alterações reprodutivas. Os comportamentos citogenético, anatômico e embrionário de poliploides totais e citoquimeras dão pistas sobre combinações de ploidias, enriquecendo o conhecimento tanto em botânica quanto em genética e no melhoramento de plantas. Enfim, dados sobre efeitos da citoquimera na produtividade são muito escassos; provavelmente este trabalho é o primeiro em culturas perenes.

Objetivos

Este trabalho teve como finalidades principais:

- a) Verificar o comportamento citogenético, embrionário e anatômico em clones poliploidizados de *Manihot esculenta* comparados à planta diploide, além de poliploides totais advindos de sementes;
- b) Caracterizar anatomicamente o desenvolvimento do saco embrionário com ploidias distintas nos clones diploide e quimeral de *Manihot esculenta* e também, indicar distinções no processo de formação do saco sexual, onde ocorrer.

Revisão bibliográfica

Citoquimeras e poliploides totais vegetais

Conceitos e aplicações

Poliploidia significa a presença de número cromossômico duplicado nas células de certo organismo (Hegarty et al, 2013), que ocorrendo em todas as células desse organismo, forma um poliploide total. Plantas citoquimerais são constituídas por mosaicos genéticos, representados por células com ploidias distintas coexistindo num mesmo tecido (Marcotrigiano e Gradziel, 1997).

Citoquimeras e poliploides totais têm ampla ocorrência na natureza (Burge et al., 2002; Comai, 2005). Culturas como as de café, amendoim, banana, aveia, tabaco, algodão, trigo, dentre outras, representam poliploides totais. Grande número das plantas exploradas economicamente teve sua produção inicial de maneira espontânea. O estudo de quimeras vegetais obteve êxito na caracterização e seleção de plantas (Burge et al., 2002). A síntese experimental de espécies vegetais quimerais que resultam na eficiência da formação de raízes ainda é privilégio de poucos (Nassar e Bomfim, 2013).

Como a indução da poliploidia é realizada normalmente em regiões meristemáticas, a penetrância do agente antimitótico pode ser total ou parcial (Marcotrigiano e Gradziel, 1997). Quando todas as camadas do meristema vegetal apresentam duplicação do número cromossômico forma-se um poliploide total, enquanto que a duplicação parcial das camadas gera as citoquimeras (Dermen e Bain, 1944; Szymkowiak e Sussex, 1996; Nassar, 2004). Três tipos de citoquimeras podem ser reconhecidos (Fig. 1) (Marcotrigiano e Gradziel, 1997): as citoquimeras mericlinais são mais restritas e instáveis, atingindo setores em uma ou duas camadas vegetais; as citoquimeras periclinais são as mais estáveis, e são reconhecidas quando uma ou mais camadas estão inteiramente constituídas por células com número

cromossômico duplicado; citoquimeras setoriais são caracterizadas pela duplicação em um setor abrangendo todas as camadas da planta.

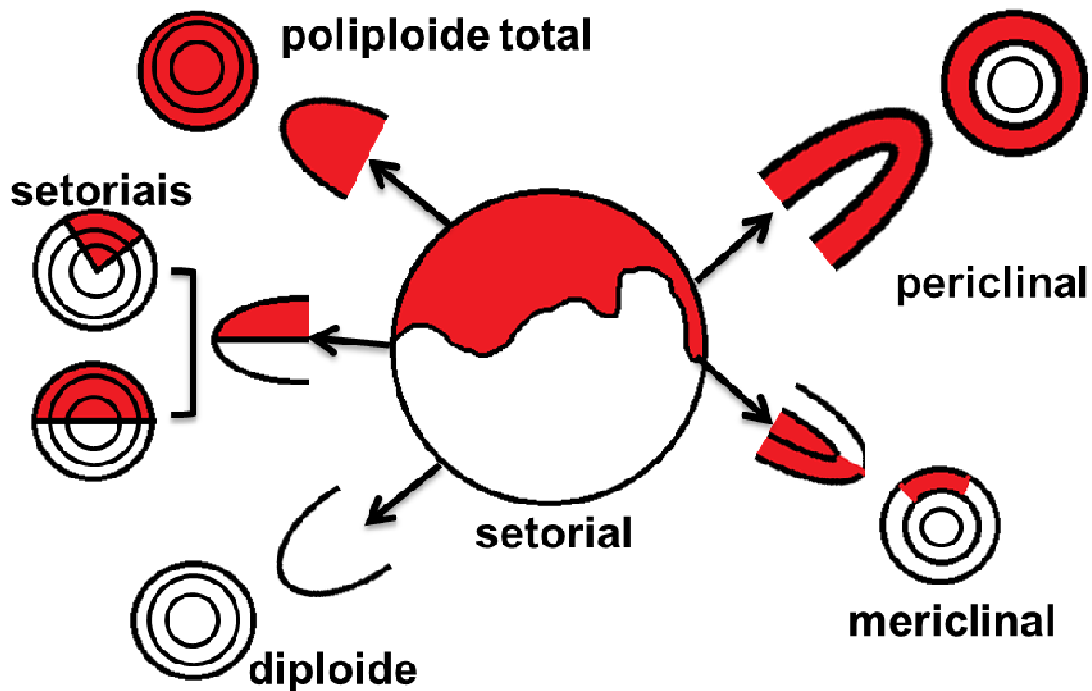


Figura 1. Vistas transversais e longitudinais de ápices meristemáticos caulinares mostrando diferentes tipos de citoquimeras vegetais (modificado de Jones. Plant Chimeras and Graft Hybrids).

A estabilidade das citoquimeras está relacionada à coexistência de tecidos com diferentes números cromossômicos em uma mesma planta ao longo do tempo. Citoquimeras periclinais são consideradas estáveis por causa da baixa frequência de substituição de camadas poliploides por camadas diploides, gerada por diferenças nas taxas de crescimento de células com ploidias distintas (Marcotrigiano e Bernatzky, 1995). Por esta razão, elas são usadas mais frequentemente em estudos investigativos que as citoquimeras mericlinais e setoriais (Burge et al., 2002).

O tratamento de gemas laterais ou outras regiões meristemáticas é aplicado em plantas de propagação vegetativa, como a mandioca (Nassar, 2003). Por isso é essencial o conhecimento da organização do meristema para o entendimento da estrutura quimeral (Marcotrigiano e Gradziel, 1997; Burge et al., 2002).

Algumas teorias têm sido propostas na tentativa de traçar a ontogenia do meristema apical em plantas superiores. A Teoria da Túnica-Corpo (Schmidt, 1924 apud Gifford, 1954) indica que a estratificação em camadas observada em cortes longitudinais de ápices meristemáticos caulinares é causada pela prevalência de divisões anticlinais nas regiões mais externas, formando a túnica, e por divisões aleatórias nas camadas mais internas, compondo o corpo; entretanto, a frequência de orientações incomuns na divisão celular pode aumentar quando a quimera apresenta células com taxas de crescimento diferentes (Stewart e Dermen, 1979).

A Teoria do Histogênio (Popham, 1951) sugere que existam três tipos de células iniciais, os quais formariam tecidos específicos. O dermatógeno daria origem à epiderme, o periblema formaria o córtex, e o pleroma a região central. Há um consenso em termos de denominação das camadas meristemáticas, em que L1 se refere à camada mais externa, L2 à camada intermediária e L3 a mais interna (Fig. 2).

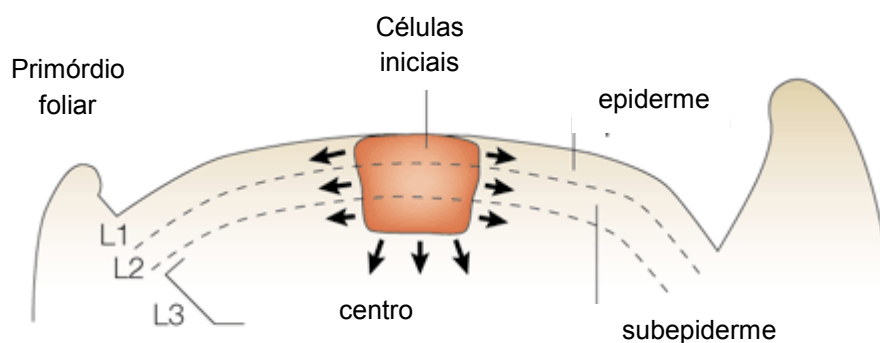


Figura 2. Meristema apical caulinar em vista longitudinal mostrando as camadas L1, L2 e L3, e a localização das células iniciais que dão origem a todo o corpo vegetal (adaptado de Clark, 2001).

O destino e a função das células meristemáticas caulinares estão relacionados à posição delas nas diferentes camadas apicais (Marcotrigiano e Bernetzky, 1995; Bowman e Eshed, 2000; Fletcher, 2002). Inclusive, há evidência de certa independência entre as camadas L1, L2 e L3 (Stewart e Burk, 1970; Marcotrigiano, 1986; Goffreda et al., 1990).

Os trabalhos clássicos de Satina e colaboradores, usando citoquimeras periclinais de *Datura*, apontam para as possíveis origens de órgãos e tecidos

vegetais, como por exemplo, L1 gera a epiderme foliar e os tegumentos ovulares, L2 é fonte para a formação de sépalas, pétalas, nucelo e células arquesporais do saco embrionário, e L3 constitui os estames, carpelo e óvulo (Satina e Blacklee, 1941, 1943; Satina, 1944, 1945).

O padrão ontogenético apresentado para *Datura* é seguido por diversos outros representantes, como em *Prunus* (Dermen, 1953), *Nicotiana* (Stewart e Burk, 1970), *Arabidopsis* (Laufs et al., 1998), *Hemerocallis* (Podwyszyńska et al., 2008), *Brassica* (Zhu et al., 2007) e *Citrus* (Chaves e Lyrene, 2009). Apesar dessa ocorrência frequente em angiospermas, a correspondência ontogenética das camadas meristemáticas não está restrita, e relatos de L1 como origem de células arquesporais (Koltunow e Grossniklaus, 2003) e L3 determinando o tamanho floral e número de carpelos em *Solanum* (Szymkowiak e Sussex, 1992) são mudanças influenciadas por outros fatores genéticos que afetam o desenvolvimento (Szymkowiak e Sussex, 1996; Tsafaris et al., 2005).

As investigações anatômica, morfológica e citogenética de órgãos e tecidos de citoquimeras têm sido empregadas na marcação e determinação do número cromossômico nas diferentes camadas do meristema apical (Burge et al., 2002). Para L1, o tamanho dos estômatos tem representado confiavelmente a ploidia da camada em plantas poliploides de *Citrus* (Yahata et al., 2005), *Platanus* (Liu et al., 2007), *Spathiphyllum* (Laere et al., 2011) e *Acacia* (Harbard et al., 2012), e em citoquimeras de *Camellia* (Stewart et al., 1972), *Hemerocallis* (Podwyszyńska et al., 2008) e *Vaccinium* (Chaves e Lyrene, 2009).

Para L2, o aumento no tamanho do grão de pólen de poliploides totais de *Manihot* (Hahn et al., 1990), *Corydalis* (Fukuhara, 2000), *Arabidopsis* (Storme e Geelen, 2011) e *Echinacea* (Abdoli et al., 2013), e de citoquimeras de *Prunus* (Dermen e Stewart, 1973) e quimeras de híbridos de *Solanum* (Khan et al., 2013) têm sido usados com sucesso na determinação de ploidia. A análise morfológica de óvulos de poliploides totais de *Corydalis* (Fukuhara, 2000), *Musa* (Fortescue e Turner, 2005) e *Acacia* (Beck-Pay, 2013), e de citoquimeras de *Datura* (Satina, 1945) também tem sido aplicada para esse propósito. De fato, o aumento de ploidia frequentemente resulta em aumento

no tamanho celular (Stebbins, 1971; Jones e Ranney, 2008; Hegarty et al., 2013), acompanhado pelo acréscimo nas dimensões de estruturas vegetativas ou reprodutivas.

Já a camada L3 pode ter sua ploidia definida através da determinação do conteúdo cromossômico em pontas de raízes, como aplicado em *Hemerocallis* (Podwyszyńska et al., 2008) e *Hosta* (Zonneveld e Pollock, 2012). Além disso, o aumento em raízes de *Capsicum* foi relacionado à poliploidização de L3 (Kulkarni e Borse, 2009). Uma vez que não tem sido possível obter quimeras periclinais em raízes, pois elas são derivadas geralmente de uma só camada (L3), a análise de meristemas apicais radiculares não segue uma organização hierárquica funcional como o meristema caulinar (Dolan et al., 1993).

Em termos bioquímicos, a poliploidia gera acréscimo de metabólitos em diversas espécies (Dhawan e Lavania, 1996; Lavania, 2013), inclusive em mandioca (Gomes e Nassar, 2013). Em aspectos fisiológicos, a poliploidia frequentemente gera modificações nas taxas de crescimento e florescimento da planta (Stebbins, 1971; Hegarty e Hiscock, 2007; Laere et al., 2011).

No melhoramento, a poliploidia é substancialmente importante por manter ou aumentar a heterose, e ainda promover o surgimento de novas variações fenotípicas (Udall e Wendell, 2006). Uma questão relevante em relação ao uso da poliploidização no melhoramento se refere à transferência e utilização da característica para futuras gerações. O potencial para a contribuição da variação herdável advinda da informação epigenética tem sido especulado (Springer, 2013), e alguns trabalhos têm apontado para possíveis efeitos no comportamento reprodutivo, promovendo a expressão da apomixia (Rodrigues e Koltunow, 2005; Grimaneli, 2012), e ao longo do desenvolvimento vegetal (Tsaftaris et al., 2008).

A poliploidia causa possivelmente alterações fenotípicas relacionadas às interações epigenéticas. A variação epigenética em aloploiploides tem sido investigada, e aparentemente existe um padrão de silenciamento dos genes copiados (Hegarty et al., 2013). Em autopoliploides de *Arabidopsis*, dois marcadores epigenéticos (metilação do DNA e metilação da histona) agem

para um duplo trancamento no silenciamento transcricional, gerando um estado epigenético extremamente estável (Baubec et al., 2010). Essa grande estabilidade apresentada em autopoliploides é um dos pontos positivos quando se trata de adaptação em longo prazo de padrões de expressão gênica (Aversano et al., 2013).

Em quimeras, os efeitos epigenéticos são relatados como resultados de interações celulares causadas pelo mosaico genético (Szymkowiak e Sussex, 1996). O tamanho, formato e cor de flores de quimeras periclinais de *Nicotiana* sofreram influência epigenética atribuída à camada L1 (Marcotrigiano, 1986). Outros exemplos de modificações de cores florais pela manipulação de L1 são encontrados em *Chrysanthemum* (Stewart e Dermen, 1970) e *Rhododendrum* (Schepper et al., 2001), assim como a cor e textura da casca de *Solanum tuberosum* (Tilney-Bassett, 1986 apud Burge et al., 2002).

Apesar de compartilhar os mesmos mecanismos de constituição genética dos poliploides totais, estudos com citoquimeras merecem atenção, pois podem elucidar possíveis efeitos epigenéticos dos mosaicos genéticos em organismos vegetais. Isso é significativamente importante quando se trata do incremento na produtividade de culturas como a de mandioca, que tem produzido cerca de 12,8 toneladas por hectare, mas com potencial para atingir 80 toneladas (FAO, 2013).

Citogenética de citoquimeras e poliploides

A investigação citogenética de plantas poliploides totais e citoquimeras leva em consideração o estudo do número e das associações cromossômicas e formações de micrósporos, que influenciam na fertilidade dos indivíduos. A poliploidização de meristemas vegetais gera células com número cromossômico duplicado, por isso, poliploides e citoquimeras são caracteristicamente similares quando se trata de conteúdo cromossômico celular.

O pareamento dos cromossomos na meiose varia dentre os tipos produzidos pela poliploidia (Stebbins, 1971), sendo normalmente encontrada a configuração de bivalentes em poliploides que também passaram por hibridização (alopoliploides), e de outras associações em poliploides advindos de endocruzamento (autopoliploides) (Comai, 2005). Associações diferentes dos regulares bivalentes podem resultar em gametas com número cromossômico desequilibrado e segregação irregular ocasionada por cromossomos retardatários, pontes e fragmentos (Valle *et al.*, 2004; Adamowski *et al.*, 2005).

Essa produção de gametas inviáveis é um dos problemas encontrados em certos poliploides, a qual conduz à redução na fertilidade (Grandont *et al.*, 2013). Este é o caso dos autopoliploides, que produzem pólen e óvulo por vezes abortados. Os aloploides, por outro lado, reverterem a queda na fertilidade gerada pela hibridização através da duplicação do conjunto cromossômico, que possibilita o pareamento regular dos cromossomos (Benavente *et al.*, 2008).

A desvantagem da infertilidade não é um obstáculo em culturas poliploides que se reproduzem vegetativamente (Ramsey e Schemske, 1998), como no caso de triploides. Nesse caso, os trivalentes gerados por divisões meióticas irregulares resultam em produtos desbalanceados, e a segregação aleatória dos tipos múltiplos de cromossomos produz quase sempre gametas inviáveis (Comai, 2005).

O estudo citogenético em citoquimeras tem se limitado à determinação do número cromossômico em células de ponta de raiz (Podwyszyńska *et al.*, 2008; Kulkarni e Borse, 2009; Zonneveld e Pollock, 2012) e em meiócitos (Dermen e Stewart, 1973; Khan *et al.*, 2013). A citogenética, aliada aos novos delineamentos traçados pela epigenética, pode promover um melhor entendimento dos cromossomos e de suas interações.

Biologia reprodutiva em angiospermas

Megagametogênese e megasporogênese em angiospermas

O desenvolvimento de sementes em angiospermas é ordenado, e sequências definidas de eventos são cruciais para a produção de sementes viáveis (Koltunow e Grossniklaus, 2003). Cronologicamente, o óvulo é o último órgão a ser formado em flores de angiospermas, sendo este composto por um ou dois tegumentos, nucelo e micrópila (Greenham e Chapman, 1990), ou ainda por um funículo (Reiser e Fisher, 1993). Há ainda uma definição mais sucinta, que engloba como partes do óvulo somente os tegumentos e o nucelo (Linkies et al., 2010).

A ontogenia do óvulo traçada em estudos com meristema apical caulinar de *Datura*, *Prunus*, *Arabidopsis* e *Brassica* (Satina, 1945; Dermen e Stewart, 1973; Bowman e Eshed, 2000; Wang et al., 2010) apontam a camada meristemática L2 como o tecido de origem do gameta. Apesar disso, relatos da influência de L3 no tamanho floral e número de carpelos em *Solanum* (Szymkowiak e Sussex, 1992), e especialmente o envolvimento de L1 na formação de sacos embrionários apomíticos ou poliembriônicos (Koltunow e Grossniklaus, 2003) levam a crer que a interação entre as camadas meristemáticas tem efeitos na expressão do modo de reprodução (Rodrigues e Koltunow, 2005).

O óvulo se desenvolve ao longo de um eixo micropilar-calazal, podendo ser classificado em cinco tipos diferentes, de acordo com o grau de curvatura: ortótropos (óvulos não encurvados), como em Polygonaceae e Pyperaceae; anátropos (óvulos não encurvados, mas invertidos), forma mais frequente inclusive em Euphorbiaceae; campilótropo (óvulo encurvado), como em Resendaceae e Leguminosae; hemítropo (nucelo e tegumentos posicionados em ângulo reto em relação ao funículo) como em *Ranunculus* e *Nothoscordum*; e anfítropo (curvatura mais pronunciada afetando o saco embrionário) como em Alismaceae, Butomaceae e *Arabidopsis* (Endress, 2011).

O nucelo é formado pelos primórdios do óvulo e é a partir dele que se origina o megasporócito ou célula mãe do megásporo (CMM), que após divisões meióticas gera o megásporo (Reiser e Fisher, 1993). Dessa maneira, o desenvolvimento do megagametófito ocorre em duas etapas: megasporogênese, englobando divisões meióticas que geram o megásporo a partir da CMM, e megagametogênese, com divisões mitóticas que formam o saco embrionário multinucleado (Yadegari e Drews, 2004).

O megagametófito é o gametófito feminino que contém as células gaméticas, sendo o megagametófito maduro conhecido como saco embrionário (Endress, 2010). Ele pode ser monospórico, bispórico ou tetraspórico, se respectivamente um, dois ou quatro megásporos participarem da formação do saco embrionário (Fig. 3) (Haig, 1990; Yadegari e Drews, 2004).

No desenvolvimento do saco embrionário com oito núcleos (Fig. 4), a primeira divisão mitótica do megásporo dá origem a dois núcleos, um micropilar e outro calazal; a segunda divisão produz um par de núcleos em cada uma das regiões citadas; a terceira divisão resulta em dois grupos com quatro núcleos cada. O conjunto micropilar se diferencia em três células do aparato da oosfera (sendo duas sinérgides) e o conjunto calazal se diferencia em três antípodas. Um núcleo de cada pólo se desloca para a região mediana do óvulo constituindo a célula média (Kägi e Groß-Hardt, 2007). O desenvolvimento e o posicionamento dos diversos núcleos e células no saco embrionário parecem ser mediados por gradientes de concentração de auxina, em que os núcleos expostos a sua alta concentração diferenciam-se em sinérgides e oosfera, enquanto os que encontram baixas taxas do hormônio tornam-se antípodas (Pagnussat et al., 2009).

	Megaesporogênese				Megagametogênese			
	CMM	Meiose 1	Meiose 2	Megásporo	Mitose 1	Mitose 2	Mitose 3	Saco maduro
Monospórico (Polygonum)								
Bispórico (Alisma)							—	
Tetraspórico (Drusa)							—	

Figura 3. Padrões de desenvolvimento do megagametófito exibido em angiospermas (adaptado de Yadegari e Drews, 2004). CMM= célula mãe do megásporo. MS= megásporo selecionado. SE= saco embrionário.

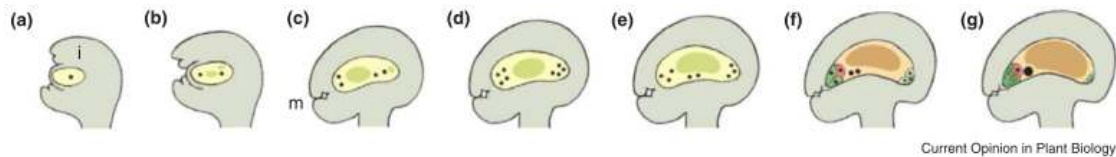


Figura 4. Desenvolvimento do saco embrionário em *Arabidopsis*. a) CMM b) primeira divisão mitótica c) segunda divisão mitótica d) terceira divisão mitótica e) migração dos núcleos para composição da célula média f) saco embrionário maduro g) fusão dos núcleos polares no momento da fertilização (adaptado de Kägi e Groß-Hardt, 2007).

O saco embrionário do tipo Polygonum pode apresentar todos os oito núcleos no estágio que antecede a fertilização, como em *Zea* (Yadegari e Drews, 2004), ou ter suas antípodas degeneradas antes da entrada do núcleo espermático, como em *Arabidopsis* (Kägi e Groß-Hardt, 2007) e *Euphorbia* (Carmichel e Selbo, 1999). Em outros gêneros, como *Paspalum* (Hojsgaard et al., 2008) e *Poa* (Yudakova, 2009) as antípodas proliferam formando um complexo. Aparentemente, não há uma função específica atribuída às antípodas; elas podem estar envolvidas no transporte de nutrientes dentro do saco embrionário (Reiser e Fisher, 1993), ou mesmo ter função secretória (Feng et al., 2013).

As sinérgides, por outro lado, possuem função no direcionamento do tubo polínico até a chegada à oosfera (Reiser e Fisher, 1993). Em *Arabidopsis* (Yang et al., 2010), uma das sinérgides se degenera na ocasião da chegada do grão de pólen, promovendo o reconhecimento e a atração do tubo polínico, e subsequentemente descarregando e transportando os núcleos vegetativo e germinativo. O aparato filiforme, expressão empregada para designar a junção das membranas das sinérgides, contém as proteínas necessárias para o reconhecimento e descarregamento dos núcleos espermáticos (Kessler e Grossniklaus, 2011), apesar de que, em *Arabidopsis*, a entrada deles pode acontecer não somente pelo aparato filiforme (Leshem et al., 2013). Em Euphorbiaceae ocorre frequentemente uma proeminência nucelar (Kapil e Bhatnagar, 1994), descrita como uma camada distinta de células que parecem permitir ou facilitar a chegada do tubo polínico até o saco embrionário.

A célula média ocupa a posição central do saco embrionário, e apresenta normalmente dois núcleos, um advindo do pólo calazal e outro do micropilar, compõem a estrutura (Sprunck e Groß-Hardt, 2011). Ela é a maior célula encontrada no megagametófito, apresentando frequentemente os maiores núcleos do saco embrionário (Jensen, 1973 apud Tilton et al., 1981). Os núcleos polares são tão similares que normalmente a distinção entre eles se torna difícil, entretanto, se há diferença de tamanho entre eles, possivelmente o núcleo de origem micropilar é o maior dentre os dois (Tilton et al., 1981).

O primeiro passo da germinação é a expansão do grão de pólen causado pela absorção de líquidos no estigma e na intina; o tubo então começa a se alongar em direção ao saco embrionário (Maheshwari, 1950). Em *Brassica*, o tubo polínico entra normalmente pela micrópila, mas algumas vezes a entrada é pela calaza (Thompson, 1933 apud Maheshwari, 1950). Em *Gossypium*, o caminho percorrido pelo tubo polínico é maior, iniciando com sua descida pelo funículo até a base do óvulo, volta ladeando a parede do próprio óvulo e entrada pela micrópila (Gore, 1932 apud Maheshwari, 1950). Em Euphorbiaceae, um tecido de transmissão denominado obturador, é o caminho percorrido pelo tubo polínico para chegar até o óvulo (Maheshwari, 1950). Esse

caminho é traçado por entre as células e não através delas. O tubo polínico normalmente colapsa após a fertilização, e pouca evidência de sua existência pode ser encontrada quando o embrião inicia seu desenvolvimento (Maheshwari, 1950). Entretanto, em algumas famílias como Lythraceae, Onagraceae e Cucurbitaceae, o tubo polínico destrói as células criando uma interrupção permanente nos tecidos (Maheshwari, 1950).

Os núcleos polares fusionam-se próximo à oosfera (Tilton et al., 1981; Kapil e Bhatnagar, 1994). Essa fusão pode acontecer anteriormente à fertilização, como ocorre em *Helianthus* (Newcomb, 1973), *Barleria* e *Crabbea* (Karlström, 1973 apud Tilton et al., 1981) e *Arabidopsis* (Mansfield e Briarty, 1990). Ela pode não acontecer mesmo após a fertilização, como em *Statices japonica* (Ya e Masa, 1941 apud Maheshwari, 1950), ou ainda ser desencadeada após a entrada do núcleo espermático no saco embrionário, como em *Gossypium* (Jensen, 1964 apud Carmichael e Selbo 1999), *Euphorbia* (Weniger 1917 e Srivastava, 1952 apud Carmichael e Selbo 1999) e *Cytisus* (Rodríguez-Riaño et al., 2006).

A fertilização da célula média por um dos núcleos espermáticos dá origem ao endosperma (Maheshwari, 1950; Yadegari e Drews, 2004; Sprunck e Groß-Hardt, 2011). A partir daí inicia-se o processo de celularização, o qual se apresenta altamente conservado em angiospermas (Olsen, 2001). O endosperma pode ser persistente, como em *Poaceae* e *Zea*, efêmero, como em *Arabidopsis* ou ainda quase inexistente como em *Orchydaceae* (Lopes e Larkins, 1993). Em *Euphorbia* ele é persistente (Carmichael e Selbo, 1999).

Três tipos distintos de endosperma podem ser reconhecidos (Lopes e Larkins, 1993). No endosperma nuclear vários ciclos mitóticos ocorrem, entretanto com citocinese tardia; assim, os núcleos são livres e ocupam a periferia da célula média. Esse tipo de endosperma é típico dos cereais, milho, soja e arroz. No endosperma celular, os ciclos mitóticos são acompanhados pela citocinese, com núcleos limitados às próprias células. As famílias *Crassulaceae*, *Bignoniaceae* e *Labiatae* são caracterizadas por esse tipo de endosperma. No terceiro exemplo, o endosperma é helobial, em que há uma

mistura dos tipos nuclear e celular, como em Hydatellaceae (Rudal et al., 2008).

A embriogênese em angiospermas tem início com a fusão dos núcleos gaméticos na via sexual. O embrião em desenvolvimento consiste de uma população crescente de células (Laux e Jürgens, 1997). A participação das células iniciais no corpo do embrião e a direção das divisões mitóticas do zigoto são critérios utilizados para uma das classificações adotadas de seus diversos tipos (Maheshwari, 1950). Na maioria dos modos conhecidos, a primeira divisão celular zigótica acontece transversalmente em relação ao óvulo, e as duas células-filhas geradas podem ou não ser equivalentes (Fig.5). A célula de posição terminal (ou calazal) pode se dividir longitudinalmente, em que somente ela mesma contribui para o desenvolvimento do embrião e a outra constitui o suspensor (tipo Onagrad) ou ambas contribuem para a formação do embrião (tipo Asterad); ou ainda dividir-se transversalmente, com a célula basal compondo o suspensor (tipo Solanad) ou com o próprio suspensor derivado da célula terminal (tipo Caryophyllad) (Maheshwari, 1950). Plantas com embrião do tipo Onagrad são encontradas nos gêneros *Capsella* (Maheshwari, 1950), *Arabidopsis* (Mansfield e Briarty, 1991) e *Euphorbia* (Carmichael e Selbo, 1999). O tipo Asterad também é relatado em *Euphorbia* (Davis, 1966), *Lactuca* (Maheshwari, 1950) e Callycanthaceae (Kimoto e Tobe, 2001). Solanad tem como representante típico *Nicotiana* (Souèges, 1922), além de *Atropa* (Yurukova-Grancharova et al., 2011). *Sedum* (Kozieradzka-Kiszkurno e Bohdanowicz, 2006) e *Sagina* (Harbaugh et al., 2010) tem embriões do tipo Caryophyllad.

Embriões com desenvolvimento atípico foram enquadrados por Maheshwari (1950) como não classificados ou anormais: *Scurrula atropurpurea* tem relatada sua primeira divisão zigótica no sentido longitudinal, formando um proembrião bisseriado; *Balanophora abbreviata* só realiza divisões longitudinais para compor o embrião; *Scabiosa succisa* divide-se diagonalmente, com posteriores divisões aleatórias; *Zea*, assim como muitos membros de Poaceae, também possui padrão irregular de divisão do embrião.

Desvios observados ao longo do desenvolvimento do saco embrionário de angiospermas são frequentemente contornados no sentido de promover ao máximo o sucesso no estabelecimento do vegetal. Dentre as estratégias observadas naturalmente e artificialmente em plantas, está a apomixia, que atua na produção de sementes sem a obrigatoriedade da fertilização da oosfera.

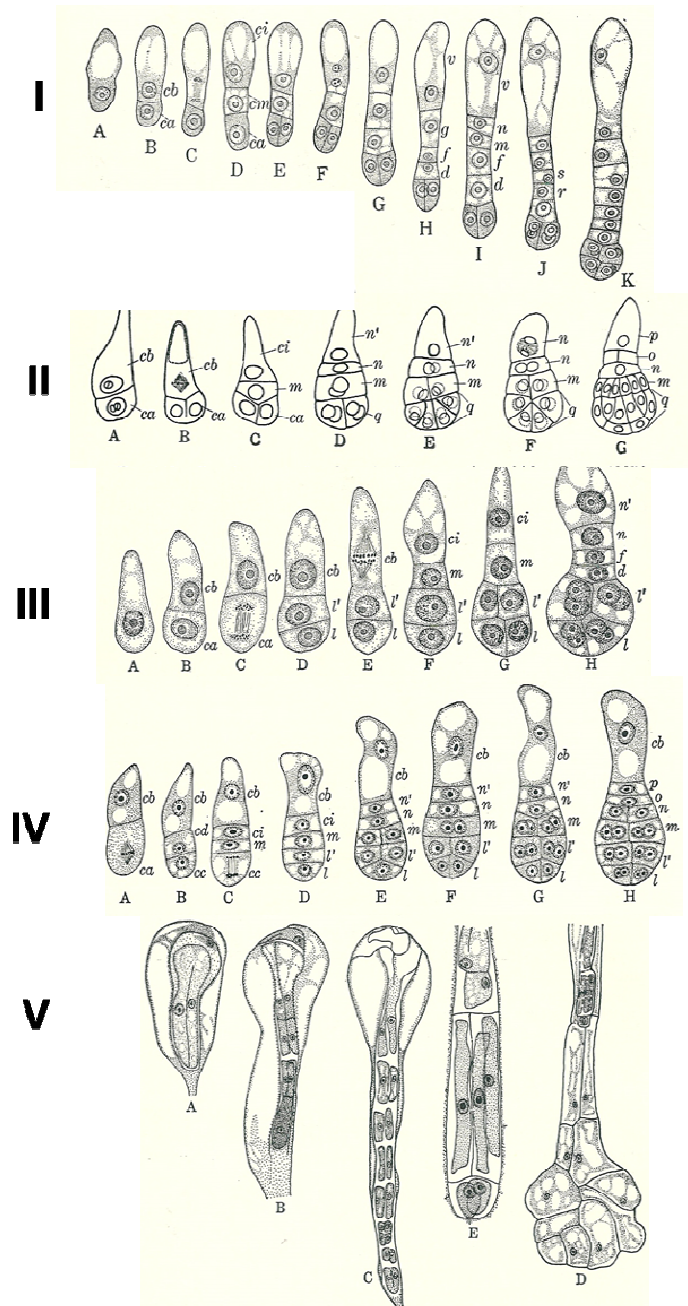


Figura 5. Padrões de divisão celular do zigoto em angiospermas. I. Onagrad. II. Asterad. III. Solanad. IV. Caryophyllad. V. Desenvolvimento de embrião atípico (*Scurrula atropurpurea*) (adaptado de Maheshwari, 1950).

Apomixia em angiospermas

Apomixia, que significa produção de sementes clonais (Spillane et al., 2001), ocorre em mais de 400 espécies e 40 gêneros vegetais (Singh et al., 2011). Por ocorrer em espécies silvestres das grandes culturas como o milho, trigo e algumas gramíneas, a apomixia recebeu muita atenção nos últimos anos. Institutos como o IRD/CIMMYT (Institut de Recherche pour Le Développement, França / Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, México); USDA-Tifton (United States Department of Agriculture, EUA); CSIRO (Commonwealth Scientific e Industrial Research Organisation, Austrália); IBONE (Instituto de Botánica Del Nordeste, Argentina), têm se dedicado em elucidar os mecanismos da apomixia (Valle *et al.*, 2004).

Os critérios científicos usualmente destinados à identificação e classificação de plantas apomíticas são os morfológicos, citogenéticos, anatômicos ou moleculares, sendo que seu uso, na maioria das vezes, ocorre de maneira conjugada. O quesito morfológico é um dos primeiros a se lançar mão para separar plantas apomíticas de sexuais, sendo a observância de progênes fenotipicamente idênticas um indicativo da ocorrência dessa característica na geração (Barcaccia e Albertini, 2013). A caracterização ontogenética dos óvulos apomíticos é tomada como um dos passos iniciais em seu estudo em plantas, seguida da investigação molecular, como observado nas principais linhas de pesquisa em apomixia desenvolvidas atualmente.

A apomixia possibilita a incorporação de marcadores genéticos que podem ser usados no melhoramento de cultivares comerciais, tornando disponíveis híbridos com maior produtividade (Hanna e Bashaw, 1987). Além de preservar o vigor e evitar a contaminação após sucessivas gerações, a apomixia permite o envio de germoplasma de um programa internacional para outros países, possibilitando também o uso desse vigor, mesmo quando presente em baixas taxas (Nassar, 2002).

As células que dão origem ao embrião apomítico podem se desenvolver a partir das camadas L1 ou L2 do meristema apical caulinar (Koltunow e Grossniklaus, 2003). O sítio de origem do embrião é o principal critério utilizado

na classificação dos tipos de apomixia, sendo distinguidos a apomixia gametofítica e embrionia adventícia (Asker e Jerling, 1992). Na apomixia gametofítica, dois mecanismos são conhecidos, a aposporia e a diplosporia (Asker e Jerling, 1992) (Fig. 6).

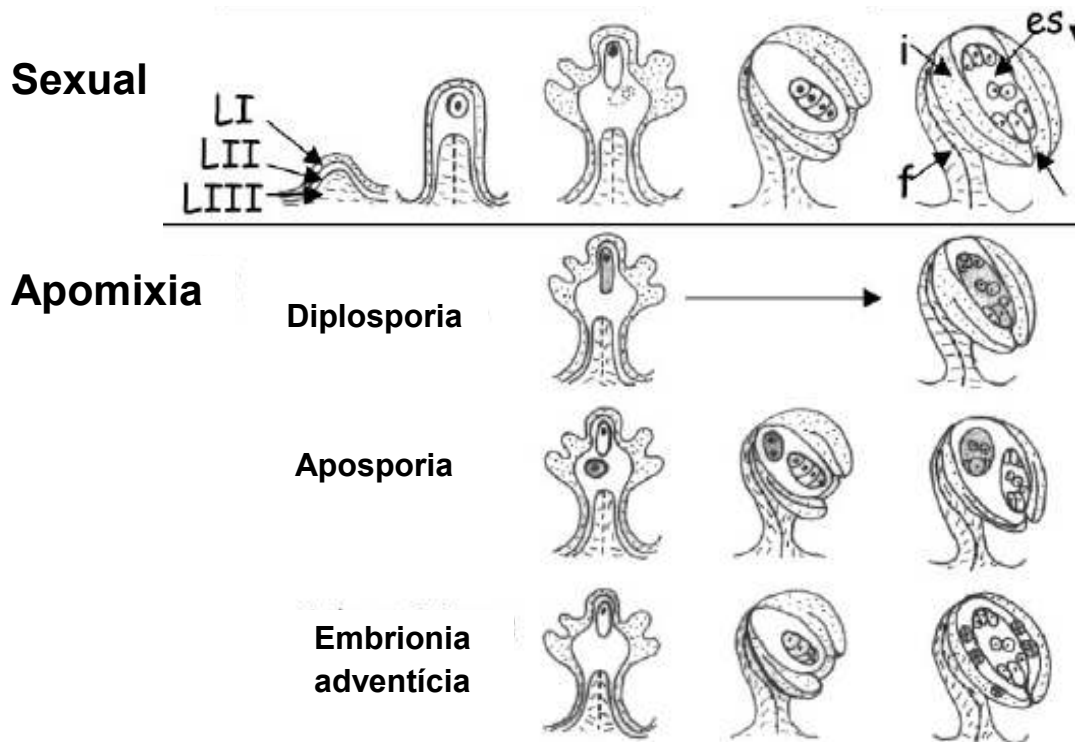


Figura 6. Esquema da formação do saco embrionário na reprodução sexual comparada à apomítica em três modalidades conhecidas: diplosporia, aposporia (apomixia gametofítica) e adventícia. es = saco embrionário, i = tegumento interno, f = funículo (adaptado de Koltunow e Grossniklaus, 2003).

Na aposporia, uma ou mais células somáticas do óvulo, ou iniciais apospóricas, alargam-se consideravelmente, dando origem a um saco embrionário unicelular (Asker, 1980; Koltunow, 1993). O tempo de iniciação do saco apospórico é frequentemente um indicativo da coexistência dos processos sexuais e apospóricos em um determinado óvulo (Koltunow, 1993). Se o saco apospórico inicia sua diferenciação tardiamente, quando a formação do saco sexual está relativamente adiantada, ambos os sacos podem coexistir (Nogler, 1984).

Sacos embrionários apospóricos frequentemente se parecem com o saco sexual no que diz respeito ao número de núcleos e organização espacial,

como observado em *Hieracium* (Koltunow, 1993). Entretanto, *Panicum* (Bashaw e Hanna, 1990) e *Brachiaria* (Araújo et al., 2005) podem apresentar de 2-4 núcleos, diferente do saco com oito núcleos encontrado em megagametófitos sexuais dos gêneros.

Na diplosporia, o saco embrionário não reduzido é desenvolvido a partir da célula mãe do megásporo (Asker, 1984). Nela, o núcleo divide-se mitoticamente e a célula cresce consideravelmente, mas não se divide (Bashaw, 1980). A identificação citológica da diplosporia deve seguir desde os primeiros estágios de desenvolvimento do saco, sendo as melhores evidências desse tipo de apomixia a ausência de meiose e megásporos em tétrades lineares (Bashaw, 1980), além de padrões de acúmulo ou ausência de calose nas células geradoras da apomixia (Bicknell e Koltunow, 2004).

No último tipo de apomixia classificado por Asker e Jerling (1992), a embrionia adventícia, o embrião pode surgir diretamente de células somáticas do nucelo ou do tegumento, em fases mais tardias do desenvolvimento do óvulo (Koltunow e Grossniklaus, 2003), sem a formação interveniente de um saco embrionário (Asker, 1984). Alguns exemplos em que a embrionia adventícia já foi relatada são os de *Trichosdesma* (Khaleel, 1977), *Oryza sativa* (Nogler, 1982 *apud* Asker e Jerling, 1992), *Citrus* (Asker e Jerling, 1992) e *M. esculenta* (Nassar et al., 2011). Um indicativo de ocorrência de apomixia adventícia em *Citrus* é a presença de calose ao redor do saco embrionário (Wilms *et al.*, 1983), sendo também este um critério para distinção de sacos apomíticos em *Brachiaria decumbens* (Dusi e Willemse, 1999).

A apomixia pode ser iniciada em vários estágios durante o desenvolvimento do megagametófito, e os eventos da reprodução sexual no mesmo óvulo são usados como referência para delimitar o início da apomixia e seu progresso (Koltunow e Grossniklaus, 2003). Em *Hieracium*, a inicial apospórica surge após o começo do desenvolvimento do saco sexual, entretanto, este é interrompido e o embrião a ser formado tem origem apomítica (Koltunow et al., 1998). Já em *Brachiaria*, o saco apospórico e o sexual coexistem temporalmente, com o desenvolvimento de embriões de ambas as origens (Araujo et al., 2000), assim como em *Paspalum*, apesar de o

produto final ser frequentemente um embrião apospórico (Hosjgaard et al., 2012). O estabelecimento de um saco em detrimento do outro ou os fatores que possibilitam a coexistência de ambos são questões ainda a serem elucidadas (Koltunow e Grossniklaus, 2003).

O controle genético da apomixia parece estar relacionado a um ou mais loci, e sua expressividade pode ser afetada por condições ambientais (Nogler, 1984; Koltunow e Grossniklaus, 2003; Ozias-Akins e Dijck, 2007) e a efeitos provocados epigeneticamente (Grimanelli, 2012; Springer, 2013). De qualquer maneira, os processos de apomeiose (desvios na divisão meiótica da célula mãe do megásporo) e partenogênese (desenvolvimento autônomo do embrião), seguidos ou não de pseudogamia (fertilização da célula média que dá origem ao endosperma), caracterizam grande parte da apomixia em angiospermas (Rodriguez-Leal e Vielle-Calzada, 2012).

Muitos apomíticos têm origem híbrida e surgiram por aloploidia (Spillane et al., 2001; Bhat et al., 2005). Segundo Carman (1997), a apomixia surge da expressão de genes reprodutivos sexuais duplicados em híbridos ou genomas poliploides. Ela parece representar uma alternativa à reprodução sexual em populações híbridas com altos níveis de esterilidade (Goldenberg e Werpachowski, 2004), permitindo a sobrevivência da espécie e perpetuação de conjuntos gênicos, sendo este um importante papel para a especiação.

Em gramíneas, a associação entre aumento da frequência de apomixia e aumento de ploidia foi relatada por diversos autores (Brown e Emery, 1958; Valle e Savidan, 1996; Quarin *et al.*, 2001; Matzk *et al.*, 2003; Hojsgaard *et al.*, 2008). Apomixia, hibridização e poliploidia também mantiveram estreitas relações em algumas dicotiledôneas (Carman, 1997), como em Rosaceae (Talent, 2009), Asteraceae (Krahulcová et al., 2011) e Brassicaceae (Lovell et al., 2013). Em *Arabidopsis* (Lee e Chen, 2001) alterações de ploidia afetaram a metilação e a expressão de diferentes alelos. Outros estudos apontam ainda uma possível correlação entre apomixia e aneuploidia, como em *Potentilla* (Asker, 1971) e em *Manihot* (Nassar, 2003).

Apesar de poliploidia e apomixia ocorrerem frequentemente associadas, o aumento de ploidia não parece ser requisito absoluto para a expressão da

apomixia (Bicknell e Koltunow, 2004). Isso se confirma com o relato de raros apomíticos em plantas diploides (Bicknell, 1997; Naumova et al., 1999; Koltunow et al., 2000).

Entre certas famílias, como Melastomastaceae, a esterilidade masculina está relacionada à ocorrência de apomixia (Baumgratz e Silva, 1986; Goldenberg e Shepherd, 1998). Entretanto, em alguns casos, indivíduos de espécies apomíticas podem apresentar níveis de fertilidade relativamente altos (Goldenberg, 2000). Em *Manihot*, a esterilidade em indivíduos apomíticos está mais associada à irregularidade meiótica que à ocorrência de apomixia em si (Nassar, 2002). Ainda assim, baixas viabilidades de pólen têm sido reportadas em híbridos apomíticos de *M. esculenta* (Nassar, 2001, 2006; Nassar et al., 2000, 2011).

A transferência da apomixia de espécies silvestres para plantas cultivadas tem sido o objetivo de diversos esforços no melhoramento (Koltunow et al., 1995; Spillane et al., 2001). A identificação dos loci que envolvidos na expressão da apomixia e uma acurada caracterização do modo sexual para determinação de mutações ou desregulação gênica são questões para o progresso dos estudos e aplicações da apomixia nas diversas áreas do conhecimento (Spillane et al., 2001).

Manihot esculenta

Citogenética de *M. esculenta*

O número cromossômico em *M. esculenta* é $2n = 36$ (Cruz, 1968; Sohmer, 1968; Carvalho e Guerra, 2002). Jennings (1963) sugeriu que o gênero tem número básico $x=9$ e possivelmente origem alopoliploide. Magoon *et al.* (1969) encontraram cromossomos em duplicata reforçando a origem alotetraploide de *M. esculenta*. Assim, a espécie apresentaria comportamento cromossômico de um diploide, com pareamento e segregação regulares dos cromossomos.

Espécies silvestres do gênero apresentam número cromossômico $2n=36$ (Cruz, 1968; Nassar, 1978), assim como o parental cultivado. Plantas com número cromossômico de 54 são consideradas triploides, e de 72, tetraploides.

Segundo Nassar (2002), a evidência citológica mais convincente de alterações meióticas causadas pela poliploidia é a ocorrência de gametas não reduzidos na espécie. O produto de uma meiose regular é a tétrade, composta por quatro micrósporos, que ficam unidos temporariamente por uma parede calósica (Brownfield e Köhler, 2011); díades e tríades são produtos de falhas na meiose causadas por distúrbios no funcionamento dos fusos (Bretagnolle e Thompson, 1995).

O primeiro relato de ocorrência de gametas não reduzidos no gênero envolveu o estudo de híbridos interespecíficos de *M. esculenta*, com formação de díades atribuídas a anormalidades no fuso meiótico (Nassar, 1992, 1994; Nassar e Freitas, 1997). Altas porcentagens de gametas não reduzidos foram observadas em outros clones de *M. esculenta*, sugerindo ser esta uma característica herdável e geneticamente controlada (Vasquez e Nassar, 1994). Os micronúcleos, díades e tríades são relatados em híbridos e tipos poliploides de *M. esculenta*, sendo possivelmente relacionados à segregação cromossômica irregular pós-metáfase (Nassar, 2000).

Associações cromossômicas regulares de bivalentes foram observadas em espécies silvestres e na cultivada, enquanto univalentes, trivalentes e quadrivalentes caracterizaram híbridos diploides e poliploides da espécie (Nassar e Freitas, 1997; Nassar, 2000, 2002; Nassar e Ortiz, 2008; Nassar et al., 2010, 2011). As configurações multivalentes em *M. esculenta* resultam em micrósporos anormais, sendo esse o fator causador da irregularidade. Aparentemente, qualquer formação multivalente diferente do pareamento bivalente, pode conduzir à produção de micrósporos e grãos de pólen inviáveis em *M. esculenta* (Hashimoto, 2009).

Apesar das irregularidades cromossômicas que acompanham os poliploides, existem certas vantagens que tornam as plantas com ploidia aumentada superiores às diploides em vários aspectos. A heterose atribuída recentemente ao efeito epigenético (Springer, 2013) torna os poliploides mais vigorosos e mais produtivos. A poliploidia representa também uma solução para a esterilidade de híbridos de mandioca, permitindo o estabelecimento do novo conjunto gênico formado (Nassar, 2000), assim como observado na história evolutiva de diversas culturas como a do algodão (Kimber, 1961), tabaco (Kenton *et al.*, 1993), trigo (Cox, 1998) e café (Lashermes *et al.*, 1998).

Assim como a poliploidia tem influência sobre a divisão meiótica, a fertilidade vegetal sofre alterações. Diversos meios para se determinar a fertilidade em plantas têm sido utilizados, como a contagem de frutos e sementes, germinação *in vivo*, germinação *in vitro*, coloração de grãos de pólen, dentre outros (Dafni e Firmage, 2000). Apesar de superestimar a viabilidade em comparação com outros métodos (Duarte-Silva *et al.*, 2011), a coloração do pólen é considerada o meio mais fácil, rápido e menos oneroso de se obter dados de fertilidade de uma planta (Dafni e Firmage, 2000), por isso tem sido amplamente utilizada para *M. esculenta* (Hahn *et al.*, 1990; Carvalho e Guerra, 2002; Nassar *et al.*, 2009, 2010; Perera et al., 2012).

Biologia reprodutiva de *M. esculenta*

M. esculenta é a única espécie cultivada dentre 98 contidas no gênero. Apesar disso, dados sobre estruturas reprodutivas femininas da espécie são limitadas, em especial na principal referência botânica sobre o gênero, a monografia de Rogers e Appan (1973).

A flor masculina da espécie tem menor diâmetro que a feminina, as anteras são alongadas e em número de dez, o ovário é súpero e composto por três carpelos com um óvulo em cada lóculo (Silva *et al.*, 2001). A quantidade de flores femininas por inflorescência é muito menor em relação às flores masculinas (Graner, 1942), com cerca de 2 flores femininas para 25 botões masculinos.

O período entre o plantio e o florescimento da planta depende da especificidade genotípica e das condições ambientais, podendo variar de um a mais de 24 meses (Byrne, 1984). A protoginia é característica do gênero (Rogers e Appan, 1973), e a diferença de abertura das flores femininas e masculinas é de uma a duas semanas (Halsey *et al.*, 2008). A flor feminina está pronta para fertilização após cerca de 20 dias de seu aparecimento, enquanto a flor masculina está apta após cerca de 30 dias, e os frutos abrem-se de 2 a 3 meses depois da fertilização (Halsey *et al.*, 2008).

O grão de pólen é grudento (Rogers e Appan, 1973) e tem como diâmetro médio 121µm (Mbahe *et al.*, 1994), podendo variar, ainda que em um mesmo genótipo, de 90 a 150µm (Halsey *et al.*, 2008). Em plantas poliploides de *M. esculenta*, o diâmetro variou de 155 a 190µm em triploides, e de 175 a 195µm em tetraploides (Hahn *et al.*, 1990).

Pouco é conhecido a respeito da ontogenia reprodutiva feminina em *Manihot* (de Toledo, 1963; Rao e Rao, 1976; Ogburia e Adachi, 1994; Perera *et al.*, 2012). Trabalhos sobre espécies silvestres do gênero referem-se ao relato do saco embrionário sexual do tipo Polygonum em *M. dichotoma* (Schnarf, 1931 *apud* Rao e Rao, 1976) e *M. palmata* (Ventura, 1940 *apud* Rao e Rao,

1976). Esse tipo também foi reportado para *M. esculenta* (Rao e Rao, 1976) (Fig. 7).

Os sacos embrionários em Euphorbiaceae, em especial em *Ricinus*, *Hevea*, *Jatropha* e *Euphorbia*, têm sido bem investigados, como exposto no

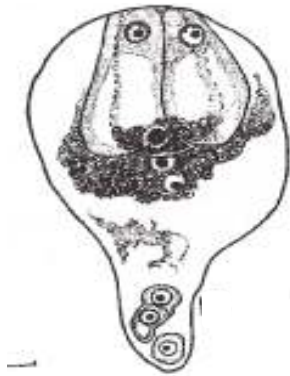


Figura 7. Esquema de saco embrionário de *M. esculenta* com oito núcleos (adaptado de Rao e Rao, 1976).

levantamento de Kapil e Bhatnagar (1994). Nesse relato, o tipo Polygonum é apresentado como o saco típico e primitivo da família. Em um híbrido entre *M. esculenta* e *M. neusana* foram observados oito núcleos compondo o saco embrionário sexual (Nassar *et al.*, 2000). Entretanto, Kapil e Bhatnagar (1994), e mais recentemente, Perera *et al.* (2012), apontam para a falta de informações mais detalhadas acerca do desenvolvimento do saco embrionário em *M. esculenta*, e conseqüentemente, no gênero a que a espécie pertence.

O trabalho com citoquimeras, conforme nossos resultados, pode representar um papel importante para futuras manipulações de características no melhoramento da cultura. O estudo da natureza apomítica na espécie pode trazer avanços, no sentido de promover a fixação de fenótipos superiores como os mais resistentes à seca e às pragas, os mais produtivos, dentre outros.

Referências bibliográficas

- Abdoli M, Moieni A e Badi HN. Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.). **Acta Physiologiae Plantarum** 1-9. 2013.
- Adamowski EV, Pagliarini MS, Bonato ABM, Batista LAR e Valls JFM. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. **Genetics and Molecular Biology** 28 (4): 773-780. 2005.
- Araujo ACG, Mukhambetzhonov S, Pozzobon MT, Santana EF e Carneiro VTC. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Le Botaniste** XXIII:13–28. 2000.
- Araujo ACG, Nobrega JM, Pozzobon MT e Carneiro VTC. Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica** 144:39–50. 2005.
- Asker S. Apomixis and sexuality in the *Potentilla argentea* complex. III. Euploid and aneuploid derivatives of some apomictic biotypes. **Hereditas** 67: 11-142. 1971.
- Asker S. Gametophytic apomixes: elements and genetic regulation. **Hereditas** 93: 277-293. 1980.
- Asker S. Apomixis and Biosystematics. In: **Plant Biosystematics**. Grant WF (eds.) Academic Press, Canada, pp. 237-243. 1984.
- Asker S e Jerling L. **Apomixis in plants**. CTC Press, Boca Raton, pp. 298. 1992.
- Aversano R, Caruso I, Aronne G, et al. Stochastic changes affect *Solanum* wild species following autopolyploidization. **Journal of Experimental Botany** 64:625–35. 2013.
- Barcaccia G e Albertini E. Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma. **Plant Reproduction** 1-21. 2013.
- Bashaw EC. Apomixis and its application in crop improvement. In: **Hybridization of crop plants**. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, pp. 45-63. 1980.

- Bashaw EC e Hanna WW. Apomictic reproduction. In: **Reproductive Versatility in the Grasses**. Chapman GP (eds.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 100-130. 1990.
- Baubec T, Dinh HQ, Pecinka A, et al. Cooperation of multiple chromatin modifications can generate unanticipated stability of epigenetic States in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 22: 34–47. 2010.
- Baumgratz JF e Silva NMF. Ecologia da polinização e biologia da reprodução de *Miconia stenostachya* DC. (Melastomataceae). **Rodriguésia** 64/66: 11-23. 1986.
- Beck-Pay SL. Confirmation of cytotype stability in autotetraploid black wattle (*Acacia mearnsii*) trees using flow cytometry and size differences of the reproductive gametes. **Southern Forests: a Journal of Forest Science** 75: 1-6. 2013.
- Benavente E, Cifuentes M, Dusautoir JC, et al. The use of cytogenetic tools for studies in the crop-to-wild gene transfer scenario. **Cytogenetics and Genome Research** 120:384–95. 2008.
- Bhat V, Dwivedi KK, Khurana JP e Sopory SK. Apomixis: An enigma with potential applications. **Current Science** 89 (11): 1879-1893. 2005.
- Bicknell RA. Isolation of a diploid, apomictic plant of *Hieracium aurantiacum*. *Sex. Plant Reprod.* 10, 168–172. 1997.
- Bicknell RA e Koltunow AM. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. **Plant Cell** 16:228–245. 2004.
- Bowman JL e Eshed Y. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. **Trends in Plant Science** 5: 110–115. 2000.
- Bretagnolle F e Thompson J. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. **New Phytologist** 129:1–22. 1995.
- Brown WV e Emery WHP. Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. **American Journal of Botany** 45(1): 253-263. 1958.
- Brownfield L e Köhler C. Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. **Journal of Experimental Botany** 1-10. 2010.

- Burge GK, Morgan ER e Seelye JF. Opportunities for synthetic plant chimeral breeding: Past and future. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**70:13–21. 2002.
- Byrne D. Breeding cassava. **Plant Breeding Review** 2:73–133. 1984.
- Carman JG. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. **Botanical Journal of the Linnean Society** 61 (1): 51-94. 1997.
- Carmichael JS e Selbo SM. Ovule, embryo sac, embryo, and endosperm development in leafy spurge (*Euphorbia esula*). **Canadian Journal of Botany** 77:599-610. 1999.
- Carvalho R e Guerra M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas** 136: 159-168. 2002.
- Chavez DJ e Lyrene PM. Production and Identification of Colchicine-derived Tetraploid *Vaccinium darrowii* and Its Use in Breeding. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 134: 356–363. 2009.
- Clark SE. Cell signalling at the shoot meristem. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. doi:10.1038/35067079. 2001.
- Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature** 6: 836-846. 2005.
- Cox TS. Deepening the wheat gene pool. **Journal of Crop Production** 1: 1–25. 1998.
- Cruz ND. Citologia no Gênero *Manihot* Mill. Determinação do número de cromossomos em algumas espécies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 40: 81-95. 1968.
- Dafni A e Firmage D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. **Plant Systematics and Evolution** 222: 113-132. 2000.
- Davis GL. **Systematic embryology of the angiosperms**. John Wiley e Sons, New York. 1966.
- De Toledo AP. Anatomia e desenvolvimento ontogenética da flor de *M. esculenta*. **Bragantia** 22: 465-476. 1963.
- Dermen H. Periclinal cytochimeras and origin of tissues in stem and leaf of peach. **American Journal of Botany** 40: 15F168. 1953.

- Dermen H e Bain HF. A general cytohistological study of colchicine polyploidy in cranberry. **American Journal of Botany** 31:451–463. 1944.
- Dermen H e Stewart RN. Ontogenetic study of floral organs of peach (*Prunus persica*) utilizing cytochimeral plants. **American Journal of Botany** 60:283–291. 1973.
- Dhawan OP e Lavania UC. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. **Euphytica** 87(2): 81-89. 1996.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, et al. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. **Development** 119:71–84. 1993.
- Duarte-Silva E, Rodrigues LR e Mariath JEA. Contradictory results in pollen viability determination of *Valeriana scandens* L. **Geneconserve** 40:234-242. 2011.
- Dusi DMA e Willemsen MTM. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica** 41: 151-162. 1999.
- Endress PK. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. **Annals of Botany** 107: 1465-1489. 2011.
- FAO. Production Yearbook. Rome. 2008.
- FAO. Cassava: a guide to sustainable production intensification. Rome. 2013.
- Feng X, Zilberman D e Dickinson H. A conversation across generations : somatogerm cell crosstalk in plants. **Developmental Cell** 24:215–225. 2013.
- Fletcher JC. Shoot and floral meristem maintenance in *Arabidopsis*. **Annual Review of Plant Biology** 53:45–66. 2002.
- Fortescue JA e Turner DW. The anatomy of ovule ontogeny of banana, plantain and enset (Musaceae). **Scientia Horticulturae** 104: 479-492. 2005.
- Fukuhara T. Variation of pollen and ovule parameters among different ploidy levels of *Corydalis* (Fumariaceae). **Plant Systematics and Evolution** 224: 1-12. 2000.
- Gifford EM. The shoot apex in angiosperms. **The New York Botanical Garden** 20:477–529. 1954.

- Goffreda JC, Szymkowiak EJ, Sussex IM, et al. Chimeric tomato plants show that aphid resistance and triacylglycerol production are epidermal autonomous characters. **Plant Cell** 2:643–9. 1990.
- Goldenberg R. Apomixia como alternativa à reprodução sexuada em Melastomataceae. In: **Tópicos atuais em Botânica**. Cavalcanti TB e Walter BMT (eds.) Embrapa Recursos Genéticos, Brasília. 2000.
- Goldenberg R e Shepherd GJ. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in cerrado vegetation. **Plant Systematics and Evolution** 211: 13-29. 1998.
- Goldenberg R e Werpachowski JS. Estudo comparativo da ocorrência de apomixia em Melastomataceae e Asteraceae. In: **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Carneiro VTC e Dusi DMA (eds.) Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p: 19-34. 2004.
- Gomes PTC e Nassar NMA. Cassava interspecific hybrids with increased protein content and improved amino acid profiles. **Genetics and Molecular Research** 12: 1214-1222. 2013.
- Graner EA. Tratamento de mandioca pela colchicina. **Bragantia** 2:23–54. 1942.
- Grandont L, Jenczewski E e Lloyd A. Meiosis and Its Deviations in Polyploid Plants. **Cytogenetic and Genome Research**. 2013.
- Greenham J e Chapman GP. Ovule structure. In: **Reproductivity Versatility in the Grasses**. Chapman GP (eds.) Cambridge University Press. 1990.
- Grimanelli D. Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms. **Current Opinion in Plant Biology** 15:57–62. 2012.
- Hahn SK, Bai KV e Asiedu R. Tetraploids, triploids and 2n pollen from diploid interspecific crosses with cassava. **Theoretical and Applied Genetics** 79: 433-439. 1990.
- Haig D. News perspectives on the angiosperm female gametophyte. *The New York Botanical Garden* 56 (3): 236-274. 1990.

- Halsey ME, Olsen KM, Taylor NJ e Chavarriaga-Aguirre P. Reproductive Biology of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and Isolation of Experimental Field Trials. **Crop Science** 48: 49-58. 2008.
- Hanna WW e Bashaw EC. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science** 27: 1136-1139. 1987.
- Harbard JL, Griffin AR, Foster S, et al. Production of colchicine-induced autotetraploids as a basis for sterility breeding in *Acacia mangium* Willd. **Forestry** 85:427–436. 2012.
- Hashimoto, DYC. Estudo comparativo entre híbridos diploides e tetraploides de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): citogenética, apomixia e anatomia caulinar. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília. 2009. 84pp.
- Hegarty M e Hiscock S. Polyploidy: Doubling up for Evolutionary Success. **Current Biology** 17: 927-929. 2007.
- Hegarty M, Coate J, Sherman-Broyles S, et al. Lessons from natural and artificial polyploids in higher plants. **Cytogenetics and Genome Research** 140:204–25. 2013.
- Hojsgaard D, Schegg E, Valls JFM, Martínez EJ e Quarín CL. Sexuality, apomixes, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris* (Poaceae). **Flora** 203: 535-547. 2008.
- Hojsgaard DH, Martí EJ, Quarín CL. Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. **New Phytologist** 197:336–347. 2012.
- Hull-Sanders HM, Johnson RH, Owen H a, et al. Effects of polyploidy on secondary chemistry, physiology, and performance of native and invasive genotypes of *Solidago gigantea* (Asteraceae). **American Journal of Botany** 96:762–70. 2009.
- Jennings DL. Variation in pollen and ovule fertility in varieties of cassava and the effect of interspecific crossing on fertility. **Euphytica** 12: 69–76. 1963.
- Jones JRTG e Ranney J. A novel method for inducing polyploidy in *Rhododendron* seedlings. **Journal of the American Rhododendron Society** 62:130-135. 2008.

- Kägi C e Groß-Hardt R. How females become complex: cell differentiation in the gametophyte. **Current Opinion in Plant Biology** 10 (6): 633-8. 2007.
- Kapil RN e Bhatnagar AK. The contribution of embryology to the systematics of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 81:145-159. 1994.
- Kenton A, Parokonny AS, Gleba YY e Bennett MD. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics** 240: 159–169. 1993.
- Kessler SA e Grossniklaus U. She's the boss: signaling in pollen tube reception. **Current Opinion on Plant Biology** 14:622–627. 2011.
- Khaleel T. Embryology of *Cordia sebestena* (Boraginaceae). **Plant Systematics and Evolution** 139 (3-4): 303-311. 1977.
- Khan MMR, Hasnunnahar M e Isshiki S. Production of amphidiploids of the hybrids between *Solanum macrocarpon* and eggplant. **HortScience** 48 422-424. 2013.
- Kimber G. Basis of the diploid-like meiotic behaviour of polyploid cotton. **Nature** 191: 98-100. 1961.
- Kimoto Y e Tobe H. Embryology of Laurales: a review and perspectives. **Journal of Plant Research** 247–267. 2001.
- Koltunow AM. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell** 5: 1425–1437. 1993.
- Koltunow AM e Grossniklaus U. Apomixis: A developmental perspective. **Annual Review of Plant Biology** 54: 547–574. 2003.
- Koltunow AM, Bicknell RA e Chaudhury AM. Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiology** 108: 1345–1352. 1995.
- Koltunow AM, Johnson SD e Bicknell RA. Sexual and apomictic development in *Hieracium*. **Sexual Plant Reproduction** 11:213–230. 1998.
- Koltunow AM, Johnson SD e Bicknell RA. Apomixis is not developmentally conserved in related, genetically characterized *Hieracium* plants of varying ploidy. **Sexual Plant Reproduction** 12:253–266. 2000.
- Krahulcová A, Krahulec F e Rosenbaumová R. Expressivity of apomixis in $2n + n$ hybrids from an apomictic and a sexual parent: insights into variation

- detected in *Pilosella* (Asteraceae: Lactuceae). **Sexual Plant Reproduction** 24:63–74. 2011.
- Kulkarni M e Borse T. Induced polyploidy with gigas expression for root traits in *Capsicum annuum* (L.). **Plant Breeding** 129: 461-464. 2009.
- Laere K, França SC, Vansteenkiste H, et al. Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. **Acta Physiologiae Plantarum** 33:1149–1156. 2011.
- Lashermes PM, Combes C, Robert J, Trouslot P, D'Hont A, Anthony F e Charrier A. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics** 261 (2): 259-266. 1998.
- Laufs P, Grandjean O, Jonak C, et al. Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 10:1375–90. 1998.
- Laux T e Jürgens G. Embryogenesis : A New Start in Life. **Plant Cell** 9:989–1000. 1997.
- Lavana UC. Polyploidy, body size, and opportunities for genetic enhancement and fixation of heterozygosity in plants. **The Nucleus** 56:1–6. 2013.
- Lee HS e Chen ZJ. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 98: 6753-6758. 2001.
- Leshem Y, Johnson C e Sundaresan V. Pollen tube entry into the synergid cell of *Arabidopsis* is observed at a site distinct from the filiform apparatus. **Plant Reproduction**. doi 10.1007/s00497-013-0211-1. 2013.
- Linkies A, Graeber K, Knight C e Leubner-Metzger G. The evolution of seeds. **New Phytologist** 186 (4): 817-831. 2010.
- Liu G, Li Z e Bao M. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. **Euphytica** 157 (1-2): 145-154. 2007.
- Lopes MA e Larkins BA. Endosperm origin, development, and function. **Plant Cell** 5:1383–99. 1993.
- Lovell JT, Aliyu OM, Mau M, et al. On the origin and evolution of apomixis in *Boechera*. **Plant Reproduction**. doi: 10.1007/s00497-013-0218-7. 2013.

- Magoon ML, Krishnan R e Vijaya Bai KV. Morphology of pachytene chromosomes and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. **Cytologia** 34: 612-626.1969.
- Maheshwari P. **An Introduction to the Embryology of Angiosperms**. Tata McGraw-Hill, New Delhi. 1950.
- Mansfield SG e Briarty LG. Endosperm cellularization in *Arabidopsis thaliana* L. *Arabidopsis*. **Canadian Journal of Botany** 27:65–72.
- Mansfield SG e Briarty LG. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac. **Canadian Journal of Botany** 69:447-460. 1991.
- Marcotrigiano M. Experimentally synthesized plant chimeras 3. Qualitative and quantitative characteristics of the flowers of interspecific *Nicotiana* chimeras. **Annals of Botany** 57: 435-442. 1986.
- Marcotrigiano M e Bernetzky R. Arrangement of cell layers in the shoot apical meristems of periclinal chimeras influences cell fate. **The Plant Journal** 7:193–202. 1995.
- Marcotrigiano M e Gradziel TM. Genetic mosaics and plant improvement. **Plant Breeding Reviews** 15: 43-84.1997.
- Matzk F, Hammer K e Schubert I. Coevolution of apomixis and genome size within the genus *Hypericum*. **Sexual Plant Reproduction** 16:51–58. 2003.
- Mbahe RE, Aken'Ova ME e Hahn SK. Germination of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) pollen. **Acta Horticulturae** 380: 172-177. 1994.
- Nassar NMA. Compatibility of cassava with four wild *Manihot* species from Central Brazil. *Turrialba* 28: 92-94. 1978.
- Nassar NMA. Production of triploid cassava, *Manihot esculenta* Crantz, by hybrid diploid gametes. **Field Crops Research** 13: 173-182. 1992.
- Nassar NMA. Unreduced microspores in cassava *Manihot esculenta* Crantz clones. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding** 64: 436-439. 1994.
- Nassar NMA. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz genetic resources: Their collection, evaluation, and manipulation. **Advances in Agronomy** 69: 179-230. 1999.

- Nassar NMA. Cytogenetics and evolution of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Genetics and Molecular Biology** 23: 1003-1014. 2000.
- Nassar NMA. The nature of apomixis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Hereditas** 134: 185-187. 2001.
- Nassar NMA. Apomixis and Cassava. **Genetics and Molecular Research** 1(2): 147-152. 2002.
- Nassar NMA. Fertility and chimera induction in cassava interspecific hybrids. **Geneconserve** 2: 117-123. 2003.
- Nassar NMA. Polyploidy, chimera and fertility of interspecific cassava (*Manihot esculenta* Crantz) hybrids. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding** 64:132-133. 2004.
- Nassar NMA. Chromosome doubling induces apomixis in a cassava x *Manihot anomala* hybrid. **Hereditas** 143: 246-248. 2006.
- Nassar NMA e Bomfim NN. Synthesis of periclinal chimera in cassava. **Genetics and Molecular Biology** 12: 610-617. 2013.
- Nassar NMA e Freitas M. Prospects of polyploidizing cassava by unreduced microspores. **Plant Breeding** 116: 195-197. 1997.
- Nassar NMA e Ortiz R. Cassava genetic resources: Manipulation for crop improvement. **Plant Breeding Reviews** 31: 247-275. 2008.
- Nassar NMA e Ortiz R. Breeding cassava to feed the poor. **Scientific American** 302: 78-84. 2010.
- Nassar NMA, Santos E e David S. Transference of Apomixis genes from *Manihot neusana* Nassar to Cassava. **Hereditas** 132: 01-05. 2000.
- Nassar NMA, Hashimoto NYC e Fernandes SDC. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research** 7(1): 16-28. 2008.
- Nassar NMA, Graciano-Ribeiro D, Hashimoto NYC, Fernandes P e Sousa JO. Cytogenetics, Embriology, and Stem Anatomy of a Cassava Interspecific Hybrid. **Cytologia** 74: 267-271. 2009.
- Nassar NMA, Graciano-Ribeiro D, Fernandes PC e Hashimoto NYC. Alterations of reproduction system in a polyploidized cassava interspecific hybrid. **Hereditas** (Lund) 147: 58-61. 2010.

- Nassar NMA, Chaib A e Elsayed AY. Apomixis in different ploidy levels of cassava. **Hereditas** 148: 125-128. 2011.
- Naumova TN, Hayward MD e Wagenvoort M. Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. **Sexual Plant Reproduction** 12:43–52. 1999.
- 119 (3): 497-505. 2009.
- Newcomb W. The development of the embryo sac of sunflower *Helianthus annuus* before fertilization. **Canadian Journal of Botany** 51: 863-878. 1973.
- Nogler GA. Gametophytic apomixis. In: **Embriology of angiosperms**. Johri BM (eds.) Springer-Verlag, Berlin. 1984.
- Nogler GA. Zur Zytogenetik der Apomixie bei *Ranunculus auricomus*. **Habilitationsschrift ETH Zürich** 916 704: 218 H. 1978.
- Ogburia MN e 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. pp. 117-127. 1994.
- Olsen OA. Endosperm development: cellularization and cell fate specification. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 52:233–267. 2001.
- Ozias-Akins P e van Dijk PJV. Mendelian Genetics of Apomixis in Plants. **Annual Review of Genetics** 41:509–537. 2007.
- Pagnussat GC, Alandete-Saez M, Bowman JL, et al. Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. **Science** 324:1684–1689. 2009.
- Perera, P.I.P., Quintero, M., Dedicova, B. et al. Comparative morphology, biology and histology of reproductive development in three lines of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae: Crotonoideae). **AoB plants**. doi: 10.1093/aobpla/pls046. 2012.
- Podwyszyńska M, Gabryszewska E, Sochacki D, et al. Histogenic identification by cytological analysis of colchicine-induced polyploids of *Hemerocallis*. **Acta Horticulturae** 886:245–249. 2008.

- Popham RA. Principal types of vegetative shoot apex organization in vascular plants. **Ohio Journal of Science** 51: 249-270. 1951.
- Quarin CL, Espinoza F, Martinez EJ, Pessino SC e Bovo OA. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction** 13:243–249. 2001.
- Ramsey J e Schemske DW. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics** 29: 467–501. 1998.
- Rao NP e Rao D. Embryology of cassava. **Proceedings of the Indian National Science Academy** 42B(2-3): 111–116. 1976.
- Reiser L, Fischer RL. The ovule and the embryo sac. **Plant Cell** 5: 1291-1301. 1993.
- Rodrigues J e Koltunow A. Epigenetic aspects of sexual and asexual seed development. **Acta Biologica Cracoviensica Series Botanica** 47:37–49. 2005.
- Rodriguez-Leal D e Vielle-Calzada JP. Regulation of apomixis: learning from sexual experience. **Current Opinion in Plant Biology** 15: 549-55. 2012.
- Rodríguez-Riaño T, Valtueña FJ e Ortega-Olivencia A. Megasporogenesis, megagametogenesis and ontogeny of the aril in *Cytisus striatus* and *C. multiflorus* (Leguminosae: Papilionoideae). **Annals of Botany** 98:777–91. 2006.
- Rogers DJ e Appan S. *Manihot, Manihotoides*. Flora Neotropica. New York, Hafner Press. pp. 272. (monograph no. 19). 1973.
- Rudall PJ, Remizowa MV, Beer A, Bradshaw E, Stevenson DW, Macfarlane TD, Tuckett RE, Yadav SR, e Sokoloff DD. Comparative ovule and megagametophyte development in Hydatellaceae and water lilies reveal a mosaic of features among the earliest angiosperms. **Annals of Botany** 101: 941–956. 2008.
- Satina S. Periclinal chimeras in *Datura* in relation to the development and structure (A) of style and stigma (B) of calyx and corolla. **American Journal of Botany** 31: 493-502. 1944.

- Satina S. Periclinal chimeras in *Datura* in relation to the development and structure of the ovule. **American Journal of Botany** 32:72–81. 1945.
- Satina S e Blackslee AF. Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. **American Journal of Botany** 28: 862-871. 1941.
- Satina S e Blackslee AF. Periclinal chimeras in *Datura* in relation to the development of the carpel. **American Journal of Botany** 30: 453-462. 1943.
- Schepper S, Leus L, Mertens E, et al. Flow cytometric analysis of ploidy in *Rhododendron* (subgenus *Tsutsusi*). **HortScience** 36 125–127. 2001.
- Schnarf K. Vergleichende Embryologie der Angiospermen. Berlin. 1931.
- Silva RM, Bandel G, Faraldo MIF e Martins OS. Biologia reprodutiva de etnovarietades de *M. esculenta*. **Scientia Agricola** 58 (1): 101-107. 2001.
- Singh M, Goel S, Meeley RB, Dantec C, et al. Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein. **Plant Cell** 23: 443-458. 2011.
- Sohmer SH. Microsporogenesis in *Manihot esculenta*. **Cytologia** 33: 97–99. 1968.
- Spillane C, Steimer A e Grossniklaus U. Apomixis in agriculture; the quest for clonal seeds. **Sexual Plant Reproduction** 14: 179-187. 2001.
- Springer NM. Epigenetics and crop improvement. **Trends in Genetics** 29:241–247. 2013.
- Sprunck S e Groß-Hardt R. Nuclear behavior, cell polarity, and cell specification in the female gametophyte. **Plant Reproduction** 24:123–136. 2011.
- Stebbins GL. **Chromosomal Evolution in Higher Plants**. Edward Arnold Ltd., London. 1971.
- Storme N e Geelen D. The *Arabidopsis* mutant *jason* produces unreduced first division restitution male gametes through a parallel fused spindle mechanism in meiosis II. **Plant Physiology** 155: 1403-1415. 2011.

- Stewart R e Burk L. Independence of tissues derived from apical layers in ontogeny of the tobacco leaf and ovary. **American Journal of Botany** 57:1010–1016. 1970.
- Stewart RN e Dermen H. Ontogeny in mono- cotyledons as revealed by studies of the developmental anatomy of periclinal chloroplast chimeras. **American Journal of Botany** 66: 47–58. 1979.
- Stewart RN, Meyer FG e Dermen H. Camellia onto daisy a graft chimera of *Camellia sasanqua* and *japonica*. **American Journal of Botany** 59:515–524. 1972.
- Szymkowiak EJ e Sussex IM. What chimeras can tell us about plant development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 47:351–376. 1996.
- Talent N. Evolution of gametophytic apomixis in flowering plants: an alternative model from Maloid (Rosaceae). **Theory in Biosciences** 128:121–38. 2009.
- Tilton VR, Lersten NR, Tilton R, et al. Ovule development in *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) with a review of selected papers on angiosperm reproduction. **New Phytologist** 88:477–504. 1981.
- Tsaftaris As, Polidoros Na, Koumproglou R, et al. Epigenetic mechanisms in plants and their implications in plant breeding. In: Tuberosa R, Phillips RL, Gale M (eds) **Proceedings of the International Congress “In the Wake of the Double Helix: from the Green Revolution to the Gene Revolution.”** Avenue Media, Bologna, Italy, pp 157–171. 2005.
- Tsaftaris AS, Polidoros AN, Kapazoglou A, et al. Epigenetics and Plant Breeding. **Plant Breeding Reviews** 30:49–178. 2008.
- Udall JA e Wendel JF. Polyploidy and Crop Improvement. **Crop Science** 46:3–14. 2006.
- Valle CB e Savidan YH. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: **Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement**. Jules JW, Mass BL, Valle CB (eds). Cali/Brasília. 1996.

- Valle CB, Bonato ALV, Pagliarini MS, Resende RMS e Jank J. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Carneiro V e Dusi DMA (eds.) Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p: 47-65. 2004.
- Vasquez N e Nassar NMA. Unreduced microspores in cassava, *Manihot esculenta* Crantz clones. **Indian Journal of Genetics** 54: 436-441. 1994.
- Wang Y, Cheng Q, Zhu X-Y, et al. Studies on reproductive characteristics of an interspecific chimera between *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 104:209–215. 2010.
- Wilms HJ, van Went JL, Cresti M e Ciampolini F. Adventive embryogenesis in *Citrus*. **Caryologia** 36: 65-78. 1983.
- Yadegari R e Drews GN. Female Gametophyte Development. **Plant Cell** 6: S133-S141. 2004.
- Yahata M, Kunitake H, Yabuya T, et al. Production of a doubled haploid from a haploid pummelo using colchicine treatment of axillary shoot buds. **Journal of American Society of Horticulture and Science** 130:899–903. 2005.
- Yang WC, Shi DQe Chen YH. Female gametophyte in flowering plants. **Annual Review of Plant Biology** 61: 89–108. 2010.
- Yudakova OI. Abnormalities of female gametophyte development in apomictic bluegrass forms. **Russian Journal of Developmental Biology** 40:150–156. 2009.
- Yurukova-Grancharova P, Yankova-Tsvetkova E, Baldjiev G, et al. Reproductive biology of *Atropa belladonna*: embryological features, pollen and seed viability. **Phytologia Balcanica** 17:101–112. 2011.
- Zhu X-Y, Zhao M, Ma S, et al. Induction and origin of adventitious shoots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. **Plant Cell Reports** 26:1727–32. 2007.
- Zonneveld BJM, Pollock WI. Flow cytometric analysis of somaclonal variation in lineages of *Hosta sports* detects polyploidy and aneuploidy chimeras. **Plant Biology** 14:972–979. 2012.

Capítulo 1

Apomixia na mandioca: avanços e desafios

Resumo

A cultura da mandioca é a mais importante nos trópicos e subtropicais. A apomixia pode revolucionar a produção da mandioca devido a vários atributos. Essas vantagens em potencial incluem a manutenção de cultivares superiores por semente sem segregação, garantindo a superioridade clonal por gerações e prevenindo contra a contaminação por bactérias e vírus. Historicamente, a apomixia foi primeiramente observada na década de 80, pelo Instituto de Agricultura Tropical, em uma progênie homogênea advinda de cruzamentos híbridos. De 1980 até 2010, a apomixia foi extensivamente estudada na Universidade de Brasília, com o intuito de se determinar os mecanismos e ocorrência do fenômeno. Os genes apomíticos ocorrem naturalmente em baixas frequências na mandioca cultivada e podem ser transferidos por cruzamentos com espécies silvestres. Aparentemente, a apomixia na mandioca é controlada por mais de um gene recessivo, que atua de forma aditiva. A aneuploidia está associada à apomixia na cultura, e pode fornecer o dobro da dosagem necessária para a ação dos genes recessivos. Usando técnicas moleculares, a homologia genética de uma progênie foi verificada, enquanto análises embriônicas têm revelado poliembriões nucelares. A poliploidia foi relacionada ao aumento da porcentagem de apomixia. A partir de uma visão evolutiva, a poliploidia tem contribuído para a produção de novas espécies, quando combinada à apomixia. Recentemente, embriões somáticos foram detectados no tegumento ovular, revelando um modo raro de apomixia documentado somente na mandioca.

Palavras-chave

Aneuploidia, aposporia, embriões adventícia, hibridização, poliploidia, esterilidade.

Apomixis in cassava: advances and challenges

Abstract

Cassava is the most important staple crop in the tropics and subtropics. Apomixis may revolutionize its production due to various attributes. These potential advantages include production by true seed, maintaining cultivars superiority over generations without segregation, and avoiding contamination by bacteria and viruses. Historically, apomixis was initially observed by International Institute of Tropical Agriculture researchers, in the 1980s, in homogenous progeny of hybrid crosses. Later, from 1980 through 2010, apomixis was extensively studied by University of Brasilia, in order to determine contributing mechanisms and occurrence. Apomixis genes occur naturally at low frequencies in cultivated cassava and can be transferred by crosses with wild species. Apparently, apomixis in cassava is controlled by more than one recessive gene, which acts in an additive form. Aneuploidy is associated with apomixis in cassava and can provide the double dosages necessary for recessive genes action. By using molecular techniques, genetic homogeneous progeny has been demonstrated, while embryonic exams have shown nucellar multiembryos. Polyploidy was found to increase apomixis percentage. From an evolutionary viewpoint, polyploidy has contributed to production of new species, when combined with apomixis. Recently, somatic embryos have been detected in integument tissue, revealing a rare model of apomixis that has only been documented in cassava.

Keywords

Adventitious embryony, aneuploidy, apospory, hybridization, polyploidy, sterility.

Algumas considerações sobre a apomixia na mandioca

Apomixia significa a produção de sementes sem fertilização. Ela tem sido investigada em várias culturas desde a década de 1940, por vários autores (Gustafsson, 1946; Brown e Emery, 1958; Nygren, 1967; Nogler, 1984; Hanna e Bashaw, 1987; Asker e Jerling, 1992; Savidan, 1992; Grimanelli et al., 2001; Koltunow e Grossniklaus, 2003; Ozias-Akins, 2006; Yudakova, 2009; Tucker et al., 2012; Hojsgaard et al., 2013). Ela tem sido estudada em 400 espécies dentro de 300 gêneros e 40 famílias de angiospermas (Carman, 1997; Singh et al., 2011). A apomixia ocorre em poucas espécies de importância agrícola, como em algumas forrageiras como *Panicum*, *Brachiaria*, *Cenchrus*, *Tripsacum*, *Hieracium* e *Paspalum*, e em frutíferas como *Citrus*, *Malus*, *Mango* e ornamentais como *Orchidacea* (Singh et al., 2011).

O primeiro relato de apomixia na mandioca veio do Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA, 1984), em que similaridades morfológicas foram observadas em progênies oriundas de cruzamentos de espécies silvestres com a planta cultivada, ao invés de progênies altamente segregantes. A primeira documentação experimental de apomixia na mandioca surgiu de observações de uniformidade morfológica em progênies, além de abundante formação de frutos em indivíduos supostamente estéreis (Nassar, 1994). As características observadas pelo autor incluíram cor e textura da raiz, cor do caule, cicatriz do pecíolo e seu comprimento, e cor de flor e fruto. Quatro clones de mandioca foram analisados (UnB 011, UnB 040, UnB 060 e Branca Santa Catarina), além de um híbrido entre mandioca e *M. dichotoma* Ule (UnB 031), embasados na uniformidade morfológica da progênie. Um deles, UnB 011, alcançou 77% de homogeneidade. A viabilidade de pólen e a contagem cromossômica indicaram uma associação entre aneuploidia e altas taxas de apomixia.

Espécies silvestres de *Manihot*, consideradas fontes de muitos caracteres úteis (Nassar, 1978), parecem ter conferido também os genes da apomixia à mandioca cultivada através de hibridizações naturais. Por isso, a apomixia é frequentemente relatada em cultivares indígenas, que cruzam

facilmente com espécies silvestres em ambientes naturais (Nassar, 1978, 1992).

Frequência do gene da apomixia na mandioca

No início dos anos 90, dois clones candidatos para apomixia facultativa, UnB 011 e UnB 031, foram investigados usando RAPD (Grattapaglia et al., 1995). Polimorfismos de DNA foram observados entre o parental materno e as progênies de UnB 011. Diversos marcadores foram encontrados na planta mãe, e ausentes na progênie, e vice-versa, claramente rejeitando a hipótese de uma origem apomítica para toda a descendência. Este resultado difere da conclusão de um estudo morfológico prévio (Nassar, 1994) que indicava 77% de apomixia no clone. Certamente, a frequência de apomixia baseada em marcadores morfológicos foi superestimada. Parece que a penetrância incompleta de marcadores genéticos ou modificações influenciadas por efeitos ambientais mascararam o fenótipo correto, especialmente em UnB 011.

Entretanto, a apomixia ocorria nos clones UnB 011 e 031, mas em baixas porcentagens. A observação de múltiplas plântulas por semente (Nassar, 1994, 2002; Nassar et al, 1998a) suportaram a hipótese de que progênies apomíticas originam-se de poliembrião nucelar. Nassar (1994) relatou que os genes de apomixia ocorriam no conjunto gênico da mandioca comum naturalmente e em frequências baixas, exercendo um importante papel na evolução de espécies do gênero.

Marcadores moleculares têm sido usados com sucesso para determinar a frequência da apomixia em híbridos de mandioca. Nassar e Collevatti (2005a, 2008) e Nassar et al. (1998b, 2006, 2009) analisaram um grande número de amostras de parentais, gerações de F₁ e F₂ de híbridos entre *M. glaziovii* x mandioca, denominados UnB 307. De acordo com seus resultados, a heterose foi baixa para todos os loci; amostras de F₂ da planta mãe apresentaram irmãos com loci diferente, tanto quando comparados entre eles quanto quando considerados em relação à planta mãe. Para a geração F₂ de 307/2, dois de

quarto eram similares ao parental. Para a geração F_2 de 307/5, um de seis era idêntico ao parental.

Tipos de apomixia na mandioca e sua transferência a partir de espécies silvestres

Seguindo a mesma linha de detecção molecular da apomixia na mandioca, Nassar et al. (1998b) analisaram a progênie F_2 de UnB 031 e UnB 200, um híbrido entre a mandioca cultivada e *M. glaziovii* Müll. Arg. Eles combinaram marcadores de RAPD e estudos embriológicos e encontraram uma estimativa mais acurada de 2% de apomixia; eles também detectaram apomixia em um segundo genótipo dentro da progênie de F_1 , além da determinação de aposporia como tipo de apomixia na mandioca. O fato de a apomixia ter sido encontrada na geração F_1 de um híbrido interespecífico leva a crer na possibilidade da transferência direta da característica de um parente silvestre para a mandioca cultivada, hipótese predita anteriormente pelos autores.

Baseando-se nas análises de RAPD, progênies de UnB 031 e UnB 200 claramente indicaram que o tipo de apomixia detectado no estudo era facultativo e ocorria em níveis muito baixos na mandioca. Em análises embriológicas desenvolvidas no mesmo trabalho, ambos os clones apresentaram sacos apospóricos e sexuais num mesmo óvulo. Aparentemente, um deles derivou-se de células somáticas ovulares, enquanto o outro se originou da célula mãe do megásporo.

Os sacos normais continham uma oosfera, dois núcleos polares e três antípodas. As sinérgides eram ocasionalmente encontradas. A oosfera era frequentemente inconspícua. As antípodas distinguam-se por possuírem formato de gota lacrimal expandida, com citoplasma denso, posição calazal, e ausência de parede separando-as da cavidade do saco. Os sacos apospóricos não continham antípodas, e somente um núcleo por saco. Algumas vezes havia um único núcleo polar e uma oosfera por saco. Esses resultados

sugerem fortemente que o mecanismo responsável pela apomixia na mandioca é a aposporia.

Num estudo com um tipo poliploidizado de mandioca, Nassar et al. (2011) relataram embriões adventícios (Figura 1A), juntamente a outros dois sacos embrionários em um óvulo (Figura 1B). Esta foi a primeira documentação de ocorrência do fenômeno na planta cultivada, particularmente em um híbrido interespecífico. Aparentemente, além da aposporia, a embrionia somática caracteriza híbridos interespecíficos da mandioca, mostrando certa plasticidade no desenvolvimento de diferentes tipos de apomixia na cultura. Outra observação foi a de que a formação de poliembriões pode acontecer independentemente da polinização e da fertilização. Esta última questão é um dos aspectos mais significativos sobre a apomixia na mandioca.

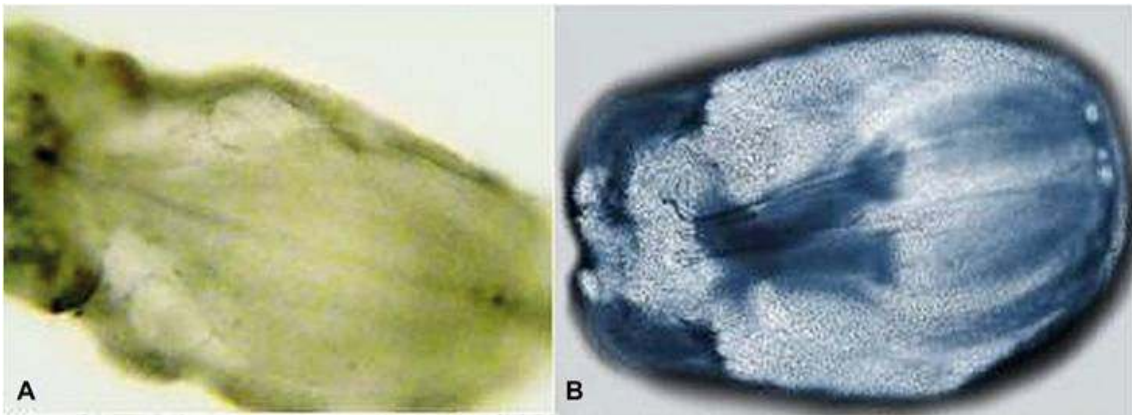


Figura 1. A. Sacos embrionários adventícios entre os tegumentos interno e externo de *Manihot esculenta*. **B.** Dois sacos embrionários em um óvulo.

Transferência da apomixia a partir de *Manihot neusana* Nassar

A descoberta da transferência da apomixia com origem em *M.glaziovii* na década de 1990 foi seguida pelo relato de sua transferência a partir de *M. neusana* (Nassar et al., 2000; Nassar, 2003a). A primeira e a segunda gerações, incluindo as plantas parentais de mandioca x *M. neusana* foram analisadas embrionicamente e citogeneticamente.

M. neusana apresentou 1,5% de frequência apomítica, enquanto essa característica foi ausente na mandioca e na geração F₁. No trabalho de Nassar et al. (2000), sacos embrionários normais foram encontrados apresentando oito núcleos (Figura 2A). Dois sacos embrionários foram observados pela primeira vez crescendo lado a lado em um indivíduo da geração F₂ (Figura 2B).

Enquanto o híbrido F₁ não mostrou apomixia nas análises embriônicas, ela foi observada numa planta da geração F₂. Isso significa que, possivelmente, a apomixia em mandioca é controlada por mais de um gene recessivo, que atua de modo aditivo, provavelmente localizado no mesmo cromossomo (Asker, 1979). Nesse caso, cromossomos adicionais na planta aneuploide F₂ (2n = 38) favoreceram a homozigose e as dosagens necessárias para a ação daqueles genes. A conexão entre apomixia e aneuploidia foi confirmada em trabalhos mais recentes (Nassar, 2002, 2003b; Nassar et al., 2000, 2009).

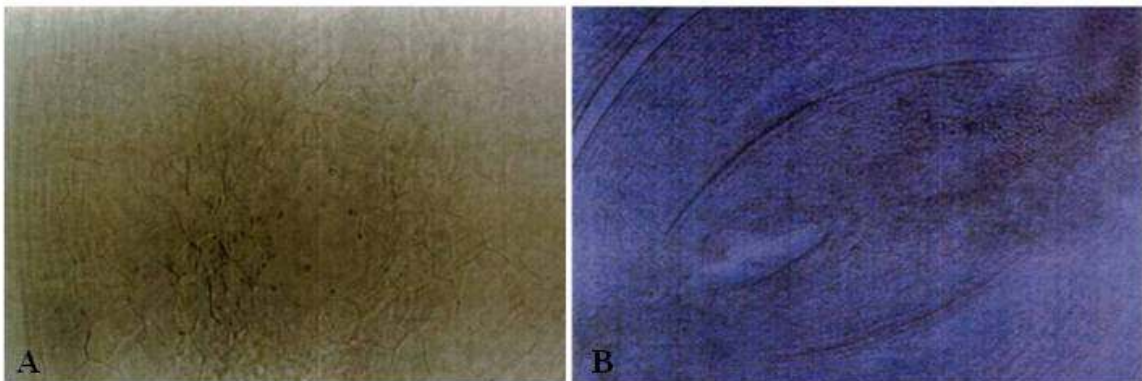


Figura 2. A. Saco embrionário sexual com oito núcleos em *Manihot esculenta*. **B.** Sacos embrionários apospórico e sexual.

Um fenômeno interessante notado nos trabalhos sobre transferência de apomixia de espécies silvestres para a cultivada é a esterilidade, que é frequentemente associada à apomixia em progênies híbridas de mandioca (Nassar, 2001; Nassar e Collevatti, 2005b). Isto foi observado em diversas plantas e estudado em detalhe na cultivar UnB 200, que é de origem híbrida entre mandioca e *M. glaziovii*. Vinte e cinco plantas foram obtidas desse híbrido por polinização aberta. A progênie foi estudada citogeneticamente e anatomicamente. Sacos embrionários foram analisados pela técnica de

clareamento in toto (Nassar et al. 2000). Estudos anatômicos revelaram sacos apospóricos em toda a progênie (Figura 3). Em alguns casos, o desenvolvimento de sacos embrionários de células dentro do saco sexual foi notado. Tanto o saco apospórico quanto o sexual cresceram em paralelo e coexistiram.

Aparentemente, a apomixia na mandioca é fortemente associada com a irregularidade meiótica e a esterilidade. A esterilidade provavelmente ativa certos genes nas células somáticas do nucelo ou do saco embrionário sexual, favorecendo a formação de sacos apospóricos. Parece que a seleção natural tem favorecido esta estrutura como um escape da extinção e um modo de perpetuação de genótipos selecionados (Nassar et al. 2008b).

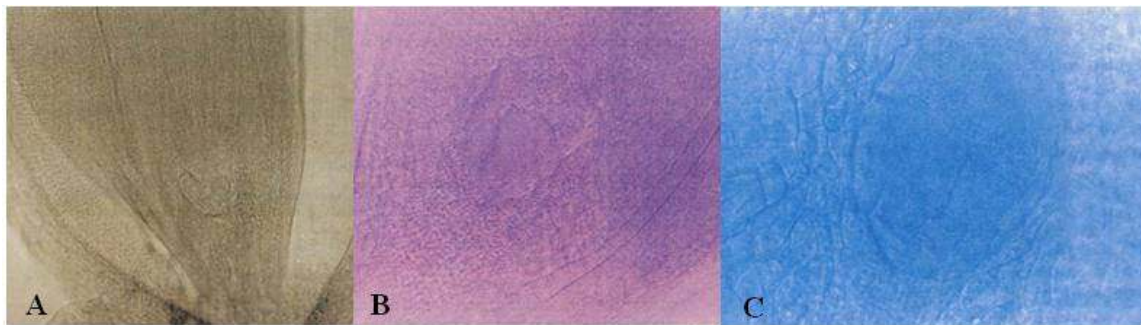


Figura 3. Sacos embrionários apospóricos em *Manihot esculenta*. **A.** Três sacos apospóricos no tecido nucelar. **B.** Saco apospórico desenvolvido dentro do saco sexual. **C.** Dois sacos apospóricos em um óvulo.

Aumento da frequência apomítica através do melhoramento

Como concluído anteriormente, as taxas de apomixia na mandioca variam de 1-2%. Entretanto, a seleção recorrente tem provado aumentar esse número para 11%, julgando-se pela frequência de poliembriões (Nassar et al., 2000). Este resultado suporta a hipótese de que a apomixia na mandioca é controlada por múltiplos fatores; o acúmulo desses fatores em certo genótipo poderia resultar em altos níveis de apomixia. O melhoramento objetiva acumular os genes aditivos da apomixia em clones superiores, sendo um desafio relevante para os melhoristas de mandioca no futuro.

Poliploidia, hibridização e apomixia na mandioca

Nassar (2002, 2006) e Nassar et al. (2008a, 2010, 2011) explicaram o papel da poliploidização e da hibridização interespecífica na especiação do gênero. Híbridos estéreis adaptados a certos ambientes podem ter perpetuado a apomixia, dando origem a novas espécies. A apomixia habilita os híbridos a manterem sua estrutura heterogênica sob condições desfavoráveis, protegendo-os contra futura recombinação.

Os híbridos poliploidizados de mandioca com *M. anomala* Pohl, *M. glaziovii* e *M. oligantha* Pax forneceram informações que apoiam essa hipótese. Eles foram estudados extensivamente por meios citogenéticos, embriônicos e morfológicos.

Essas plantas poliploidizadas apresentaram 72 cromossomos em todos os híbridos investigados, e poliembriões foram observados microscopicamente (Figura 4) com frequência de cerca de 29% nos híbridos com *M. oligantha*, comparados à 1% na planta mãe.

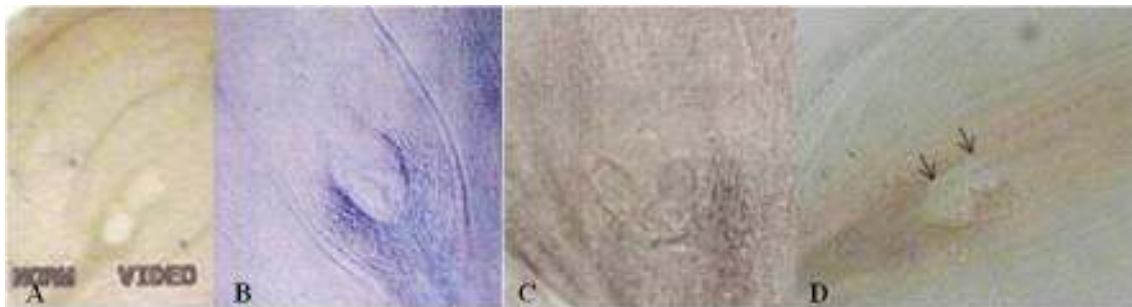


Figura 4. A-C. Sacos embrionários apomíticos em híbridos poliploidizados de *Manihot glaziovii* x mandioca. D. Saco apomítico no híbrido poliploidizado entre *M. oligantha* x mandioca.

Em seu levantamento sobre apomixia e poliploidia, Carman (1997) relata que elas mantêm estreita relação, e enfatiza sua ocorrência simultânea em angiospermas. Mais recentemente, Nassar et al. (2008b) detectaram a natureza apomítica pela análise do saco embriônico de híbridos naturais entre *M. tripartita* Müll. Arg. e *M. caerulescens* Pohl. Ele cresceu estável por várias gerações, demonstrando ser uma nova espécie evoluída. Esta observação

sobre a combinação de hibridização e poliploidia apoia a ideia de que ambos fenômenos devem ter desempenhado um papel importante na evolução da apomixia em espécies de *Manihot*. A hibridização leva a novos tipos mais adaptados a certos ambientes, enquanto a poliploidia aumenta o número de genes aditivos responsáveis pela apomixia, perpetuando esses genótipos.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A Coleção Viva de mandioca foi estabelecida na década de 1970 com o apoio do International Development Research Centre (IDRC), Canadá, ao qual também somos gratos.

Referências

- Asker S (1979). Progress in apomixis research. *Hereditas* 91: 231-240.
- Asker S and Jerling E (1992). Apomixis in plants. Boca Raton, London.
- Brown WV and Emery WPH (1958). Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. *Am. J. Bot.* 45: 253-263.
- Carman JG (1997). Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bipospority, tetraspority and polyembryony. *Biol. J. Linn. Soc.* 61: 51-94. 1997.
- Grattapaglia D, Costa C and Nassar NMA (1995). Strict maternal inheritance of RAPD fingerprints confirms apomixis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Can. J. Plant Sci.* 76: 379-382.
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E et al. (2001). Developmental genetics of gametophytic apomixes. *Trends Genet.* 17: 597-604.

- Gustafsson A (1946). Apomixis in the higher plants. I. The mechanism of apomixis. *Lunds Univ. Arssk.* 42(3): 1-66.
- Hanna WW and Bashaw EC (1987). Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Sci.* 27: 1136-1139.
- Hojsgaard DH, Martinez EJ and Quarin CL (2013). Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. *New Phytol.* 197 (1): 336-347.
- IITA (International Institute of Tropical Agriculture) (1984). Annual Report. IITA, Nigeria.
- Koltunow AM and Grossniklaus U (2003). Apomixis: a developmental perspective. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 547-574.
- Nassar NMA (1978). Some further species of *Manihot* with potential value to cassava breeding. *Can. J. Plant Sci.* 58: 915-916.
- Nassar NMA (1992). Cassava in South America: A plant breeder viewpoint. *Braz. J. Ass. Adv. Sci.* 44: 25-28.
- Nassar NMA (1994). Development and selection for apomixis in cassava *Manihot esculenta* Crantz. *Can. J. Plant Sci.* 74: 857-858.
- Nassar NM (2001). The nature of apomixis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Hereditas* 134: 185-187.
- Nassar NMA (2002). Apomixis and cassava. *Genet. Mol. Res.* 1:147–52.
- Nassar NM (2003a). Gene flow between cassava, *Manihot esculenta* Crantz, and wild relatives. *Genet. Mol. Res.* 2: 334-347.
- Nassar NMA (2003b). Is apomixis in cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) associated with aneuploidy? *Gene Conserve* 2 (7): 106-110.
- Nassar NMA (2006). Chromosome doubling induces apomixis in a cassava x *Manihot anomala* hybrid. *Hereditas* 143: 246–8.
- Nassar NMA and Collevatti RG (2005a). Breeding cassava for apomixis. *Genet. Mol. Res.* 4: 710-715.

- Nassar NMA and Collevatti RG (2005b). Microsatellite markers confirm high apomixis level in cassava bred clones. *Hereditas* 37:33–37.
- Nassar NMA and Collevatti R (2008). Embryonic, Meiotic and Molecular Analysis of Apomictic Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Gene Conserve*: 7 (29): 497-517.
- Nassar NMA, Vieira MA, Vieira C and Grattapaglia D (1998a). Evidence of apomixis in cassava, *Manihot esculenta* Crantz. *Genet. Mol. Biol.* 21: 527-530.
- Nassar NMA, Vieira MA, Vieira C and Grattapaglia D (1998b). Molecular and embryonic evidence of apomixis in cassava interspecific hybrids (*Manihot* spp.). *Can. J. Plant Sci.* 78: 349-352.
- Nassar NMA, dos Santos E and David S (2000). The transference of apomixis genes from *Manihot neusana* Nassar to cassava, *M. esculenta* Crantz. *Hereditas* 132: 167-170.
- Nassar NMA, Kalkmann DC and Collevatti RG (2006). A further study of microsatellite on apomixis in cassava. *Gene Conserve*: 5 (22): 320-326.
- Nassar NMA, Kalkmann D, Hashimoto D and Chaib A (2008a). A clue to the role of apomixis in *Manihot* speciation. *Gene Conserve*: 7 (30): 608-619.
- Nassar NMA, Hashimoto D and Castilho AP (2008b). Apomixis induces new species of *Manihot*. *Gene Conserve* 7 (30): 636-642.
- Nassar NMA, Gomes PTC, Chaib AM, Bomfim NN, Batista et al. (2009). Cytogenetic and molecular analysis of an apomictic cassava hybrid and its progeny. *Genet. Mol. Res.* 8:1323–30.
- Nassar NMA, Graciano-Ribeiro D, Gomes PF and Hashimoto DYC (2010). Alterations of reproduction system in a polyploidized cassava interspecific hybrid. *Hereditas* 147(2):58–61.
- Nassar NMA, Chaib A and Elsayed AY (2011). Apomixis in different ploidy levels of cassava. *Hereditas* 148 (4-5): 125-128.
- Nogler GA (1984). Gametophytic apomixis. In: Embryology of Angiosperms (Johri BM, ed.). Springer Verlag, Berlin, 475-518.

- Nygren A (1967). Apomixis in the angiosperms. In: *Encyclopedia of Plant Physiology* (Ruhland W ed.). Springer-Verlag, Berlin, 551-596.
- Ozias-Akins P (2006). Apomixis: developmental characteristics and genetics. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25: 199–214.
- Savidan Y (1992). Progress in research on apomixis and its transfer to major grain crops. In: *Reproductive Biology and Plant Breeding* (Dattée Y, Dumas C and Gallais A, eds.). Springer-Verlag, Berlin, 269–279.
- Singh M, Goel S, Meeley RB, Dantec C et al. (2011). Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein. *Plant Cell* 23: 443-458.
- Tucker MR, Okada T, Johnson SD, Takaiwa F and Koltunow AM (2012). Sporophytic ovule tissues modulate the initiation and progression of apomixis in *Hieracium*. *J. Exp. Bot.* 63: 3229-3241.
- Yudakova OI (2009). Abnormalities of female gametophyte development in apomictic bluegrass forms. *Russ. J. Dev. Biol.* 40(3):150–156.

Capítulo 2

Citogenética e comportamento anatômico de citoquimeras e poliploides totais em mandioca

Resumo

Cultivares de citoquimeras periclinais, híbridos interespecíficos e poliploides totais de mandioca foram estudados em relação ao comportamento embriônico, citogenético e anatômico. Eles tiveram seus ápices meristemáticos caulinares, grãos de pólen, flores femininas e masculinas, raízes, estômatos e período de florescimento analisados. As citoquimeras exibiram aumento no tamanho das células em L1 e L2. A poliploidia levou à expansão dos estômatos nas quimeras, enquanto L2 gerou configurações tetraploides, irregularidades de tétrades, redução da viabilidade de pólen e aumento na frequência de sacos poliembriônicos. A composição quimeral de L1 e L2 tetraploides e L3 diploide promoveu a expressão notável do efeito epigenético no alargamento das raízes, comparada aos diploides totais. Um dos tipos quimerais apresentou completa inibição do florescimento. A viabilidade e o diâmetro do pólen mostraram-se marcadores confiáveis para a determinação de ploidia em mandioca.

Palavras-chave

Apomixia, meristema apical caulinar, epigenética, produtividade de raízes, viabilidade de pólen.

Cytogenetics and anatomical behavior in cytochimeras and total polyploids cassava

Abstract

Cassava periclinal cytochimeras, cultivars, interspecific hybrid and polyploid types were studied in relation to embryonic, cytogenetic, and anatomical behaviour. They had their apical shoots, pollen grains, male and female buds, roots, stomata and flowering period analyzed. Chimeras exhibited increased size of L1 and L2 cells. Polyploidy led to enlargement of stomata in chimeras while L2 gave tetraploid chromosome configurations, tetrad irregularity, decrease of pollen viability and increase of polyembryo sacs frequency. Chimera composition of tetraploid L1 and L2 and diploid L3 expressed a notable epigenetic effect seen in a very enlargement of edible roots compared to total diploid. One of the chimeric types was accompanied by complete flowering inhibition. Pollen viability and diameter revealed a reliable marker to determine ploidy levels.

Keywords

Apical meristems, apomixis, epigenetic, pollen viability, root productivity.

Introdução

Manihot é um gênero com 100 espécies conhecidas (FAO, 2013). Todas as espécies investigadas tem número cromossômico $2n=36$, incluindo a espécie cultivada *Manihot esculenta* Crantz (Nassar, 1978; Carvalho e Guerra, 2002). A poliploidia tem executado um importante papel na evolução das espécies cultivadas, e tem sido empregada com sucesso no melhoramento de cultivares produtivos (Sreekumari et al., 2000; Ceballos et al., 2004; Nassar e Ortiz, 2008).

Em plantas de propagação vegetativa, como é o caso da mandioca, poliploides artificiais podem ser obtidos com o tratamento de colchicina em gemas laterais, seguido da propagação por estaquia (Nassar, 2003). Entretanto, quimeras podem surgir como resultado da infiltração incompleta da colchicina nas três camadas meristemáticas (Nassar, 2003). Isso pode formar inicialmente quimeras setoriais, que logo se transformam em periclinal pelo processo de substituição (Marcotrigiano e Bernatzky, 1995). A forma estável é normalmente a periclinal, e ela pode ser identificada pelo exame dos tecidos derivados das camadas L1, L2 e L3 (Burge et al., 2002). A primeira forma a epiderme, a segunda os gametas, e a terceira compõe o cilindro central, incluindo o periciclo, que é o responsável pela formação de raízes (Zhu et al., 2007).

Mandiocas poliploides mostraram-se produtivas (Hahn et al., 1990; Gomes e Nassar, 2013); entretanto, não há disponível outra referência à citoquimera e seu papel na produtividade. A poliploidia foi também citada em relação à formação poliembriônica e ocorrência de apomixia em mandioca (Freitas e Nassar, 2013). Nós tentamos explicar neste trabalho os limites e as potencialidades da poliploidização na indução de alterações poliembriônicas e na frequência de apomixia. A literatura disponível sobre citoquimeras em culturas de tubérculos é escassa, ainda mais em mandioca. Até onde sabemos, este é o primeiro relato sobre o assunto.

Material e métodos

Material vegetal

Quatro cultivares e um híbrido interespecífico de mandioca, além de uma progênie advinda de um tipo poliploidização, foram usados neste estudo. Uma curta descrição deles segue abaixo.

UnB 530. Cultivar indígena. Arbusto ereto, cerca de 1-1,5m de altura. Cicatrizes peciolares proeminentes, com cerca de 1 cm. Caules jovens verde-avermelhados, assim como pecíolos, flores e frutos. Ovário alado. Raízes cilíndricas. Denominado neste trabalho por UnB 530.

UnB 530p. Ramo de UnB 530 poliploidizado artificialmente com colchicina, e propagado vegetativamente (Nassar, 2003). Arbusto ereto a semi-decumbente, com cerca de 0,5-2 m de altura. Caules jovens verde-avermelhados, assim como pecíolos, flores e frutos. Ovário alado. Raízes cilíndricas (Nassar et al., 2012). Denominado neste estudo como UnB 530p.

Progênie de UnB 530p. Progênie obtida de livre polinização de UnB 530p, constituindo 37 indivíduos denominados 530-1 a 530-37.

UnB 530-5. Indivíduo triploide da progênie de UnB 530p. Arbusto ereto a semi-decumbente, com cerca de 1-1,5 m de altura. Ramos dicótomos, eretos a semi-decumbentes. Caules jovens verde-avermelhados, assim como pecíolos, flores e frutos. Ovário alado. Raízes cilíndricas. Denominado neste estudo por 530-5.

UnB 530-19. Indivíduo triploide da progênie de UnB 530p. Arbusto ereto a semi-decumbente, com cerca de 1-2,5 m de altura. Ramos dicótomos, eretos a semi-decumbentes. Caules jovens verde-avermelhados, assim como pecíolos, flores e frutos. Ovário alado. Raízes cilíndricas. Denominado neste estudo por 530-19.

UnB 307-1. Cultivar de mandioca. Arbusto ereto a semi-decumbente, com cerca de 1-2 m de altura. Cicatrizes do pecíolo proeminentes, com cerca de 0,8 cm. Caule, pecíolos, flores e frutos salpicados de púrpura. Ovário levemente

alado. Raízes cilíndricas, com comprimento entre 30-80 cm e diâmetro de 2-30 cm. Denominado como 307-1.

UnB 307-1 poli. Ramo poliploidizado artificialmente de UnB 307-1 pela aplicação de colchicina e propagado vegetativamente (Nassar, 2003). Arbusto ereto a semi-decumbente, com cerca de 2 m de altura. Cicatrizes do pecíolo proeminentes, com cerca de 1 cm. Caule e pecíolos salpicados de púrpura. Raízes cilíndricas, com comprimento entre 10-80 cm e diâmetro de 2-35 cm. Denominado como Quimera 307-1.

***Manihot glaziovii* x *M. esculenta*.** Híbrido produzido sexualmente (Nassar, 2003). Arbusto ereto, com cerca de 2,5 m de altura. Cicatrizes do pecíolo não proeminentes. Caule, pecíolo, flores e frutos com pontos avermelhados. Ovário levemente alado. Raízes fibrosas. Denominado Glaz híbrido.

***Manihot glaziovii* x *M. esculenta* poli.** Ramo poliploidizado artificialmente pela aplicação de colchicina e propagação vegetativa do híbrido *Manihot glaziovii* x *M. esculenta* (Nassar, 2003). Arbusto ereto, com cerca de 3 m de altura. Cicatrizes não proeminentes dos pecíolos. Caule, folhas, flores e frutos verdes com alguns pontos avermelhados. Ovário com ala não proeminente. Raízes fibrosas. Denominado como Quimera glaz.

Todas essas plantas estão propagadas e estabelecidas na Coleção Viva de *Manihot* na Estação Experimental da Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

Anatomia do ápice meristemático caulinar

Ápices meristemáticos de UnB 530, UnB 530p, 307-1, Quimera 307-1, Glaz híbrido and Quimera glaz foram coletados e fixados em Carnoy por 14 dias. Eles foram desidratados e incluídos em parafina (Kraus e Arduin, 1997), corados duplamente e montados em resina (Paiva et al., 2006). Cortes longitudinais de 6 µm foram feitos em micrótomo rotativo Leica RM 2145. Duas secções de cada planta tiveram vinte células medidas em cada camada L1, L2 e L3. O teste de Tukey foi aplicado com $p \leq 5$ ente camadas da mesma amostra.

Morfologia, tamanho e densidade estomáticas

Folhas com 1 cm² de UnB 530, UnB 530p, 530-5, 530-19, 307-1, Quimera 307-1, Glaz híbrido e Quimera glaz foram secas e cobertas com ouro em pó no metalizador Leica EM SCD 500, e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 700 1-F para observações morfológicas. Para as medições, cinco folhas retiradas na altura do quarto nó das plantas citadas tiveram sua face abaxial próximo à nervura central coberta por duas camadas de esmalte incolor (Kraus e Arduin, 1997). Essas impressões foram colocadas em lâminas com água, e um total de nove fotos por amostra foram tiradas com a objetiva de x40. O tamanho dos estômatos foi considerado a partir das margens externas das células-guarda. A densidade foi calculada para uma área de 1 mm². O teste de Tukey foi aplicado com $p \leq 5$.

Fertilidade e morfologia do pólen

A fertilidade das plantas foi medida levando-se em conta a viabilidade do grão de pólen e a formação de sementes. O número de óvulos por ovário desde os estágios iniciais de desenvolvimento até a semente madura foram considerados, e a taxa óvulo/ovário (para sementes imaturas e semente/fruto (para sementes maduras) foi obtida. O período de florescimento foi registrado para as plantas neste estudo de março de 2009 a abril de 2013.

Para a viabilidade de pólen e investigação dos micrósporos, flores masculinas foram coletadas, fixadas em Carnoy, conservadas em etanol 70% e coradas em acetocarmina a 2% (Nassar, 2003). UnB 530, UnB 530p, 530-5, 530-19, 530-36, 307-1, Quimera 307-1, Glaz híbrido and Quimera glaz foram analisadas para a presença de díades, tríades ou políades (Nassar, 2003), com ou sem micronúcleos.

Análises meiótica e mitótica

Para o estudo meiótico, flores masculinas com comprimento de cerca de 1-3 mm foram mantidas em solução aquosa de colchicina e glicerina a 0,002 M por seis horas. Elas foram então coletadas e fixadas em Carnoy por 14 dias, e conservadas em etanol 70%. A coloração foi feita com acetocarmina a 2% (Nassar, 2003). As associações cromossômicas foram classificadas como univalentes, bivalentes, trivalentes ou tetravalentes, com a média simples calculada pela análise de dez células metafásicas.

Para a investigação mitótica, pontas de raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina 0,002 M por 24 horas, fixadas em Carnoy e mantidas em etanol 70%. Para a preparação das lamínas, as raízes foram submersas em HCl 5N por 10 minutos e coradas em reativo de Schiff por duas horas (Kraus e Arduin, 1997), seguida por acetocarmina a 2% (Nassar, 2003). O número cromossômico foi determinado pela contagem de pelo menos dez células.

Anatomia do saco embrionário

Sacos embrionários maduros de todas as plantas que floresceram foram analisados pela técnica de clareamento (Young et al., 1979) em microscópio de contraste interferencial. Óvulos com um saco embrionário foram classificados como normais; óvulos com mais de um saco foram considerados poliembriônicos.

Produtividade de raízes

A formação de raízes comestíveis nas cultivares UnB 530 (3 indivíduos), UnB 530p(3 indivíduos) e 530-19 (2 indivíduos) foram registrados através do cálculo média do número de raízes e peso. Elas foram mantidas sob as mesmas condições de adubação e irrigação, e arrancadas após um ano do plantio.

Os microscópios de luz Leica DM 2500 e Zeiss Axioscop 2 foram usados para a observação das imagens. Leica Application Suite 4.0 ou Photoshop CS4

foram os softwares empregados para a captura e edição. As medidas de estômato e grão de pólen foram tomadas com Image Pro Plus version 4.5.0.29, e para os testes estatísticos usou-se Assistat 7.6 beta.

Resultados

Anatomia do ápice caulinar

Os cortes longitudinais dos ápices meristemáticos revelaram camadas bem definidas (Figura 1). Todas elas apresentaram divisões anticliniais e pericliniais. O teste de Tukey mostrou diferença significativa entre as amostras (Tabela 1). Comparando as médias de altura das células entre as plantas diploides e as quimerais, foi observado um aumento no tamanho das camadas L1 e L2. A camada L3 permaneceu com tamanho inalterado, com diferença estatística não significativa nas plantas deste estudo.

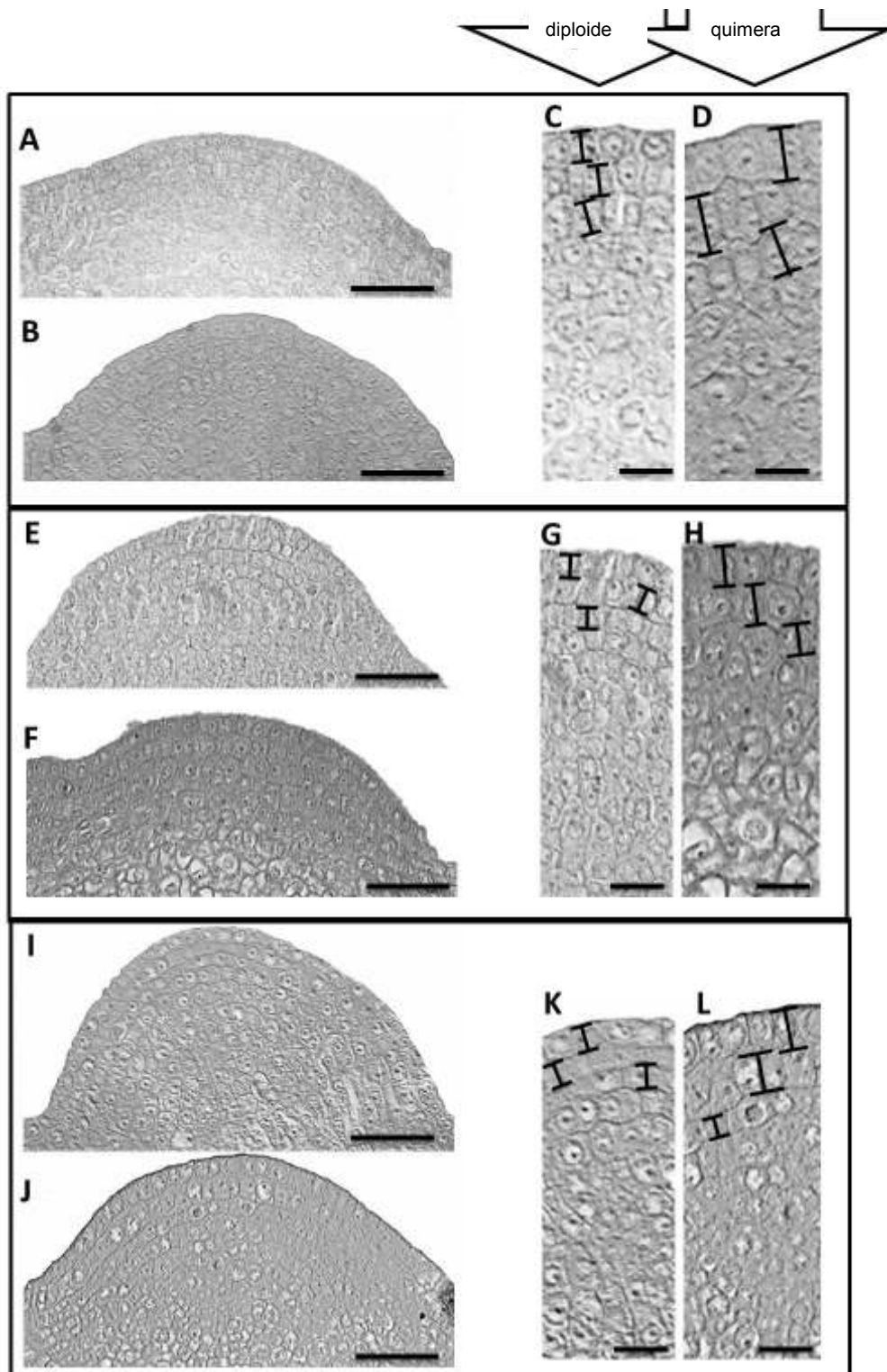


Figura 1. Cortes longitudinais de meristemas apicais de tipos diploides (UnB 530, 307-1 e Glaz híbrido) e de quimeras de mandioca (UnB 530p, Quimera 307-1 e Quimera glaz) mostrando L1, L2 e L3. A. UnB 530. B. UnB 530p. C. Detalhe de UnB 530, note a semelhança na altura das células nas camadas. D. Detalhe de UnB 530p. Note a semelhança no tamanho das células em L1 e L2. E. 307-1. F. Quimera 307-1. G. Detalhe de 307-1. H. Detalhe de Quimera 307-1. Note que as camadas L1 e L2 são maiores que L3. I. Glaz híbrido. J. Quimera glaz. K. Detalhe de Glaz híbrido. L. Detalhe de Quimera glaz. Note L1 e L2 maiores que L3. Barra = 30 μ m (A, B, E, F, I, J); 20 μ m (C, D, G, H, K, L).

Tabela 1. Médias da altura de vinte células em dois ápices meristemáticos por amostra das plantas diploides (UnB 530, 307-1 e Glaz híbrido) e quimerais de mandioca (UnB 530p, Quimera 307-1 and Quimera glaz) representadas em L1, L2 e L3 (em micrômetros). Letras iguais indicam diferença estatística não significativa.

Amostra	L1	L2	L3
UnB 530	13,4b	11,6c	13,3a
UnB 530p	16,4a	16,7b	14,1a
307-1	7,8d	8,5d	8,1d
Quimera 307-1	12,1c	12,6c	7,8d
Glaz híbrido	11,9c	11,7c	10,8c
Quimera híbrido	17,2a	18,4a	11,5c

Estômatos em diploides, triploides e citoquimeras

Estômatos vistos foram do tipo paracíticos em todas as amostras (Figura 2). A média de comprimento e densidade estomáticos mostraram diferenças entre as amostras (Figura 3). UnB 530p teve estômatos maiores que UnB 530, e assemelhando-se a 530-5; 530-19 também teve comprimento maior que UnB 530. Quimera glaz apresentou os maiores valores de comprimento do estômato, quase seis vezes maiores que Glaz híbrido. A densidade estomática não seguiu um padrão em relação ao aumento ou decréscimo de ploidia em amostras de diploides, triploides ou quimerais de UnB 530; entretanto, para as quimeras 307-1 e Quimera glaz, a densidade diminuiu com o aumento na ploidia.

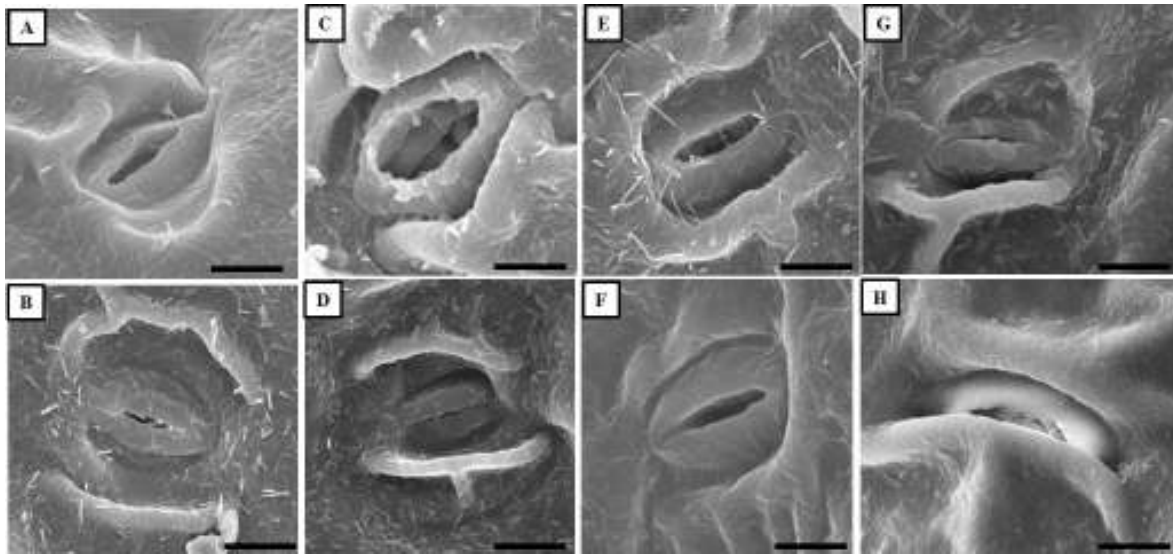


Figura 2. Estômatos paracíticos em microscopia eletrônica de varredura nas faces abaxiais de tipos diploides (UnB 530, 307-1 e Glaz híbrido), triploides (530-5 e 530-19) e quimerais de mandioca (UnB 530p, Quimera 307-1 e Quimera glaz). A. UnB 530. B. UnB 530p. C. 530-5. D. 530-19. E. 307-1. F. Quimera 307-1. G. Glaz híbrido. H. Quimera glaz. Barra = 10 μm .

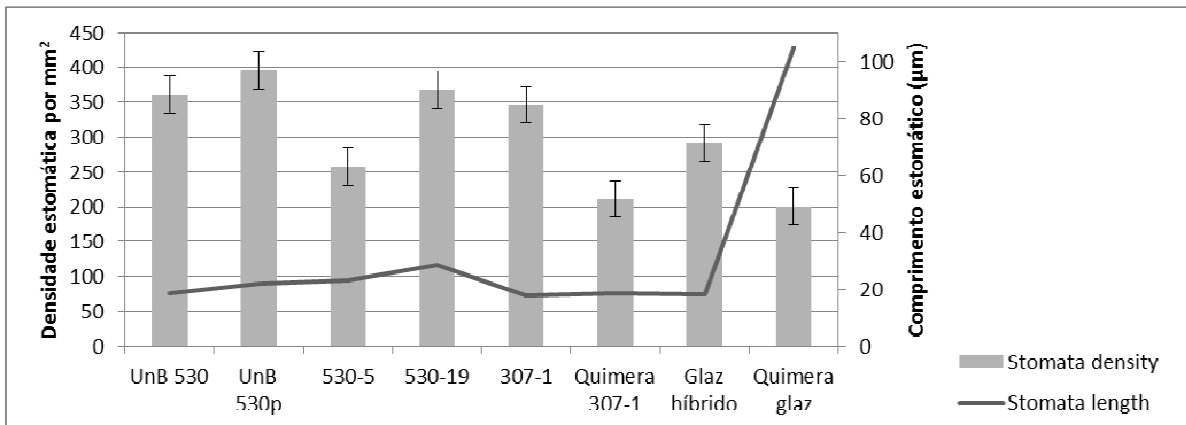


Figura 3. Médias do comprimento e densidade estomáticos de tipos diploides (UnB 530 – 216 medidas, 307-1 - 159 e Glaz híbrido - 104), triploides (530-5 - 121 e 530-19 - 232) e quimerais de mandioca (UnB 530p - 242, Quimera 307-1 - 120 e Quimera glaz - 175). Barras pequenas indicam o erro padrão.

Fertilidade e morfologia do pólen

O período de florescimento dos tipos diploides, poliploides e quimerais de mandioca, observado de março de 2009 a abril de 2013, está representado graficamente (Figura 4). Das 49 plantas, 30 floresceram. A cultivar diploide UnB 530 floresceu por um tempo mais longo (30 meses) quando comparados com

as outras plantas, que estiveram de 3-20 meses nessa fase. Quimera 307-1 não floresceu durante os quatro anos de observação. Quimera glaz teve o período de florescimento mais longo (10 meses) que o tipo híbrido diploide Glaz híbrido (5 meses). O florescimento ocorreu geralmente nos primeiros semestres dos anos.

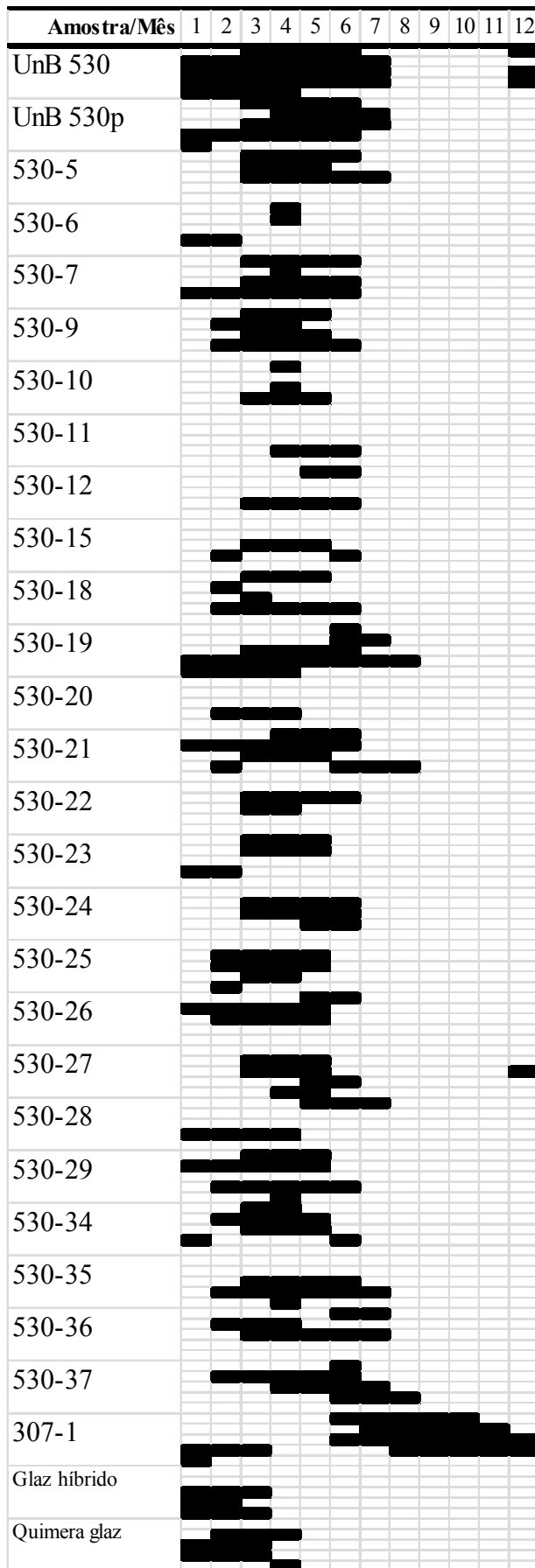


Figura 4. Estágios de florescimento dos tipos diploides (UnB 530, 307-1 e Glaz híbrido), triploides (530-5 e 530-19), tetraploides (530-6, 530-7, 530-9, 530-10, 530-11, 530-12, 530-15, 530-20, 530-21, 530-22, 530-23, 530-24, 530-25, 530-26, 530-27, 530-28, 530-29, 530-34, 530-35, 530-36, 530-37) e quimerais de mandioca (UnB 530p e Quimera glaz) ao longo de 50 meses de observação em campo. Linhas pretas correspondem ao florescimento. Cinco linhas por planta representam cada ano de observação; os números na porção superior indicam os meses do ano.

Considerando a maturação dos óvulos e produção das sementes, os tipos diploides, poliploides e quimerais de mandioca apresentaram óvulos anátropos e bitegumentares, em ovários tricarpelados, exceto em Glaz híbrido, que também revelou ovários bicarpelados (Figura 5A) e tetracarpelados (Figura 5B). A razão óvulo/ovário variou de 2,1 a 2,9 e a de semente/fruto de 1,0 a 2,7 (Figura 6).

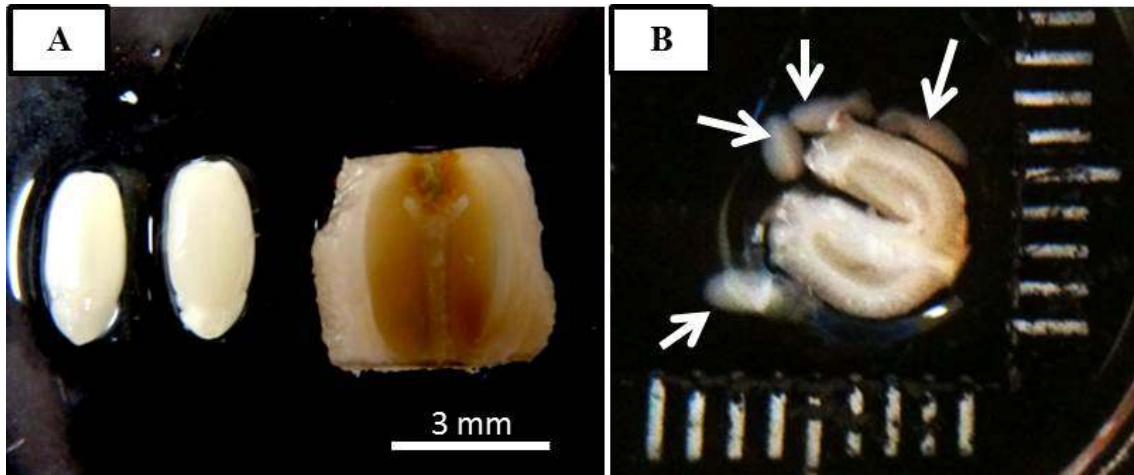


Figura 5. Ovários dissecados de Glaz híbrido com dois (A) e quatro (B) óvulos. Subunidades em B = 1 mm.

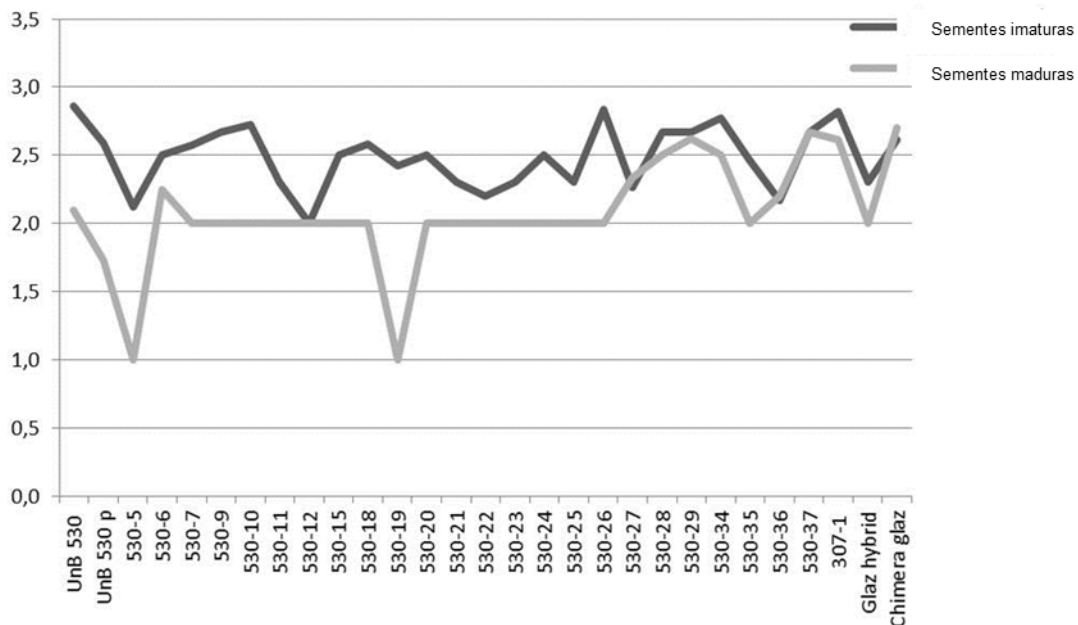


Figura 6. Taxa de óvulos/ovários (sementes imaturas) e sementes/frutos (sementes maduras) de tipos diploides, poliploides e quimerais de mandioca. Um total de 867 ovários e 162 frutos foram analisados.

As médias de diâmetro do grão de pólen das plantas diploides, poliploides e quimerais de mandioca variaram de 123,13 a 180,22 μm . UnB 530, 530-18, 307-1 e Glaz híbrido tiveram os valores mais baixos. Os maiores foram observados em 530-1, 530-6, 530-9, 530-13, 530-15, 530-34, 530-35, 530-36, UnB 530p e Quimera glaz (Figura 7).

A viabilidade de pólen nos diferentes tipos de mandioca variou de 34 a 95,7%. O teste de Tukey aplicado em experimento inteiramente casual mostrou dois grupos ocupando as faixas extremas de viabilidade, e um grupo intermediário. As plantas diploides tiveram alta viabilidade, as triploides e híbridos contiveram os valores mais baixos, e as tetraploides possuíam porcentagens intermediárias. Os tipos quimerais de UnB 530p and Quimera glaz também apresentaram alta viabilidade de pólen. Plantas triploides apresentaram menores viabilidades e grãos de tamanho intermediário; plantas citoquimerais tiveram alta viabilidade e grãos grandes (Figura 8).

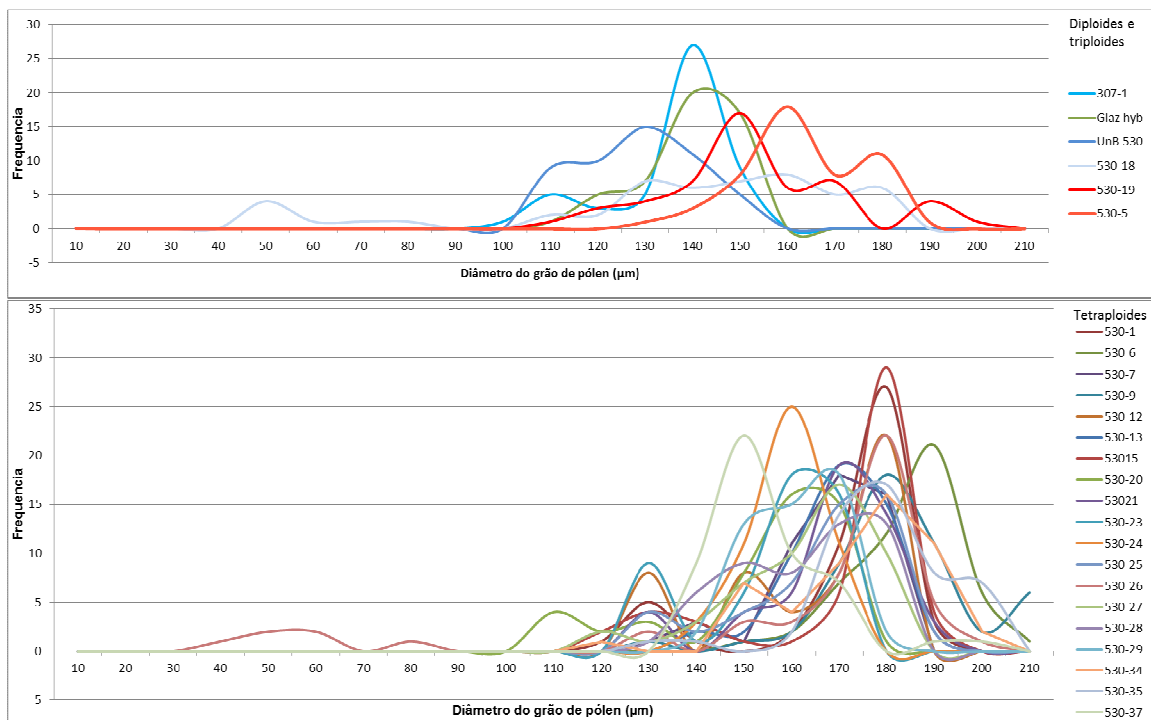


Figura 7. Diâmetros de grãos de pólen de tipos diploides, triploides (quadro superior) e tetraploides (quadro inferior) de mandioca, além das citoquimeras UnB 530p e Glaz Quimera.

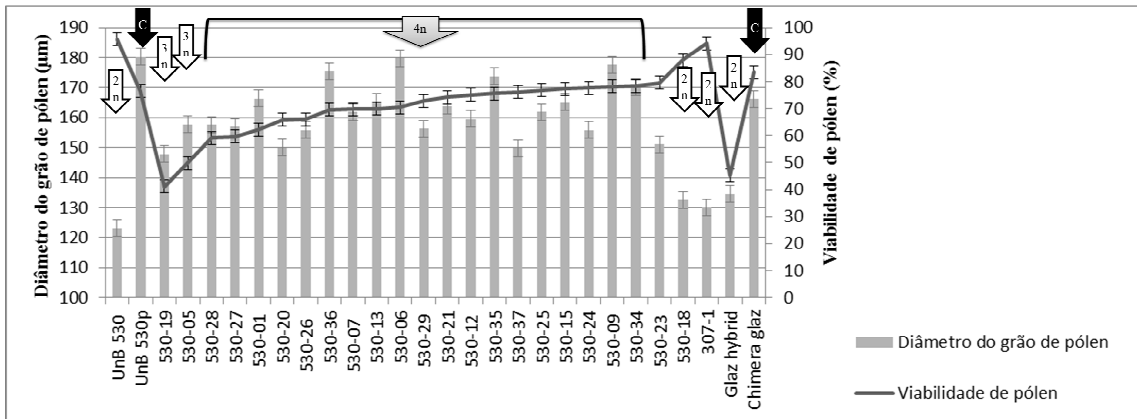


Figura 8. Médias das porcentagens de viabilidade de pólen de um mínimo de 1000 grãos em plantas diploides (2n), triploides (3n), tetraploides (4n) e quimeras de mandioca (C) e seus respectivos diâmetros a partir de 50 medidas por planta. Barras pequenas indicam o erro padrão de cada medida.

O estudos dos micrósporos (Figura 9) mostrou alta regularidade nas cultivares diploides UnB 530 e Quimera glaz, e porcentagens relevantes de tétrades com micronúcleo em UnB 530p, 530-5, 530-19 e 530-36. As cultivares 307-1 e Glaz híbrido tiveram ocorrência significativa de díades (Tabela 2).



Figura 9. Micrósporos nos tipos diploides (UnB 530, 307-1 e Glaz híbrido), triploides (530-5 e 530-19), tetraploide (530-36) e quimerais de mandioca (UnB 530p e Quimera glaz). Da esquerda para a direita, díade, díade com micronúcleo, tríade, tríade com micronúcleo, tétrade, tétrade com micronúcleo e políade, respectivamente. Barra = 25 µm.

Tabela 2. Porcentagem de microspores observados nos tipos diploides (UnB 530, 307-1 e Glaz híbrido), triploides (530-5 e 530-19), tetraploide (530-36) e quimerais de mandioca (UnB 530p e Quimera glaz). N = ausência de micronúcleo. MN = presença de micronúcleo.

Amostra	Díades		Triades		Tétrades		Políades		Número de micrósporos
	N	MN	N	MN	N	MN	N	MN	
UnB 530	0,0	0,0	3,5	0,3	95,4	0,8	0,0	0,0	368
UnB 530p	0,0	0,0	1,1	0,0	51,3	47,6	0,0	0,0	649
530-05	0,4	0,4	2,0	3,5	49,8	38,9	3,9	1,1	283
530-19	0,0	0,4	2,3	4,9	29,6	61,2	0,4	1,2	513
530-36	0,0	0,0	2,8	0,7	56,3	40,1	0,1	0,0	684
307-1	0,0	0,0	0,0	0,0	89,4	12,6	0,0	0,0	346
Glaz híbrido	9,5	0,0	0,0	0,0	86,3	3,7	0,4	0,0	241
Quimera glaz	0,0	0,0	1,4	0,0	97,8	0,8	0,0	0,0	356

Análise cromossômica

A contagem mitótica e análise de associações meióticas de diploides, poliploides e quimeras estão representadas esquematicamente (Figura 10). A configuração meiótica de UnB 530 revelou 36 cromossomos associados em 18 bivalentes (Figura 10A), enquanto UnB 530p teve uma média de 2 univalentes, 26 bivalentes, 0,4 trivalentes e 3,8 tetravalentes, compondo 72 cromossomos (Figura 10B). Os dois indivíduos da progênie de UnB 530p, 530-5 (Figura 10C) e 530-19 (Figura 10D), apresentaram 54 cromossomos, com um média de 2 univalentes, 23 bivalentes e 3 trivalentes para 530-19. O outro indivíduo, 530-36, teve uma média de 2,6 univalentes, 19,4 bivalentes, 0,6 trivalentes e 7,2 tetravalentes, totalizando 72 cromossomos (Figura 10E). A cultivar 307-1 exibiu $2n=36$, numa configuração de 18 bivalentes (Figura 10F). Em observações mitóticas, Quimera 307-1 (Figura 10G), Glaz híbrido (Figura 10H) e seu tipo quimeral (Figura 10I) apresentaram 36 cromossomos. As associações cromossômicas em Quimera glaz tiveram uma média de 2 univalentes, 25 bivalentes e 5 tetravalentes, num total de 72 cromossomos (Figura 10J).

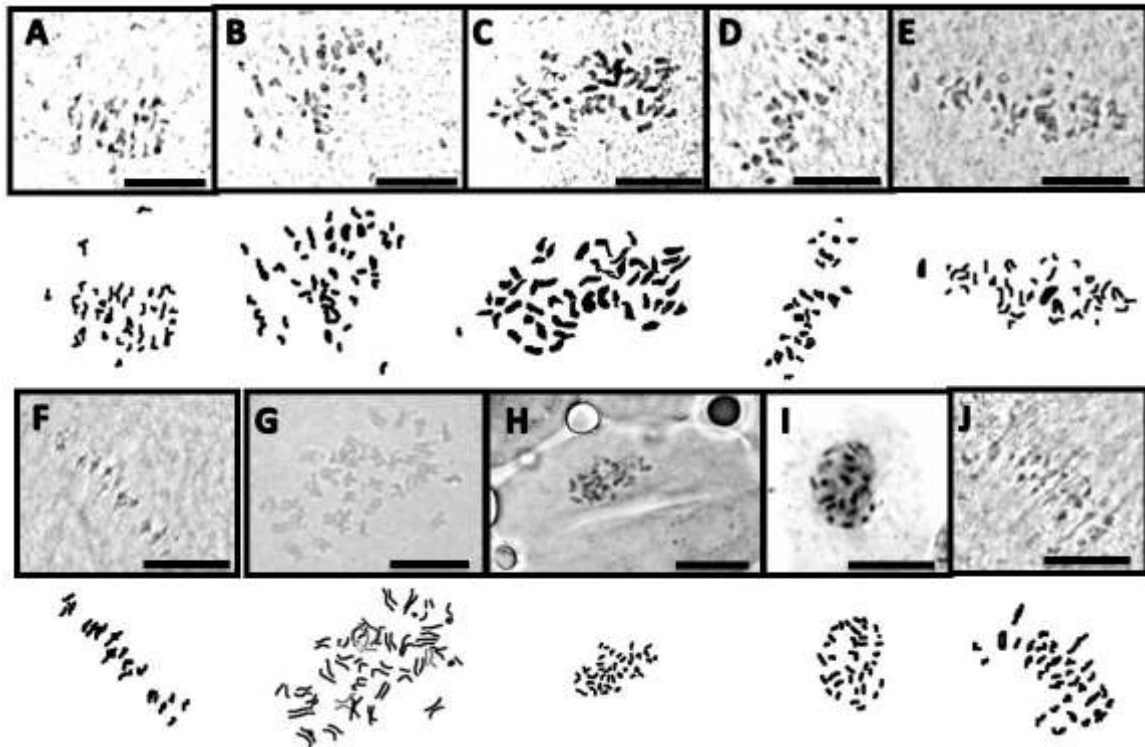


Figura 10. Cromossomos em meiose (A, B, D, E, J) e mitose (C, F, G, H) em tipos diploides (UnB 530, 307-1 e Glaz híbrido), triploides (530-5 e 530-19), tetraploide (530-36) e quimeras de mandioca (UnB 530p, Quimera glaz). A. UnB 530, 36 cromossomos. B. UnB 530p, 72 cromossomos. C. 530-5, 54 cromossomos. D. 530-19, 54 cromossomos. E. 530-36, 72 cromossomos. F. 307-1, 36 cromossomos. G. Quimera 307-1, 36 cromossomos. H. Glaz híbrido, 36 cromossomos. I. Quimera glaz, 36 cromossomos. J. Quimera glaz, 72 cromossomos. Esquemas de cromossomos estão representados abaixo de cada imagem. Barra = 10 μ m.

Análises do saco embrionário

Óvulos de sacos maduros dos tipos triploides 530-5, 530-19 e Glaz híbrido revelaram altas quantidades de sacos abortados, enquanto as outras plantas tiveram predominantemente estruturas sexuais normais (Figura 11). O comprimento do ovário em sacos maduros variou de 4-6 mm. Flores de UnB 530p e Quimera glaz apresentaram dois sacos embrionários por óvulo (Figura 12) numa frequência de 1,3 e 3,3%, respectivamente (Tabela 3). Dentre as amostras analisadas da progênie de UnB 530p não foram detectados sacos poliembriônicos.

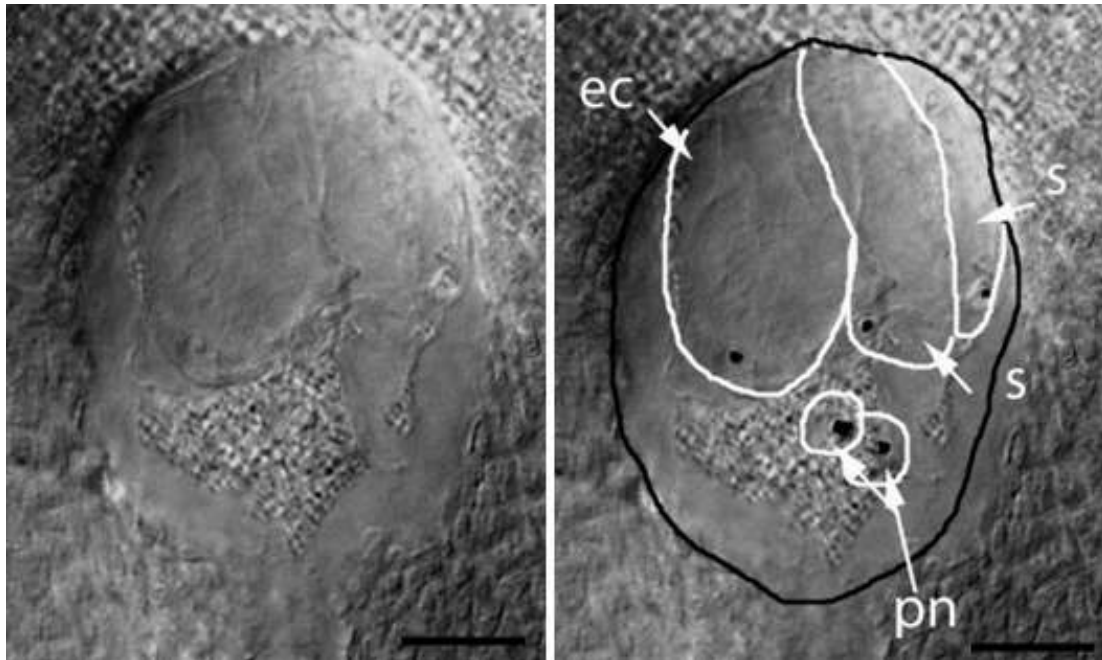


Figura 11. Saco embrionário sexual da cultivar diploide UnB 530. Ele contém duas sinérgides (s), a oosfera (ec) e dois núcleos polares (pn). Barra = 25 μ m.

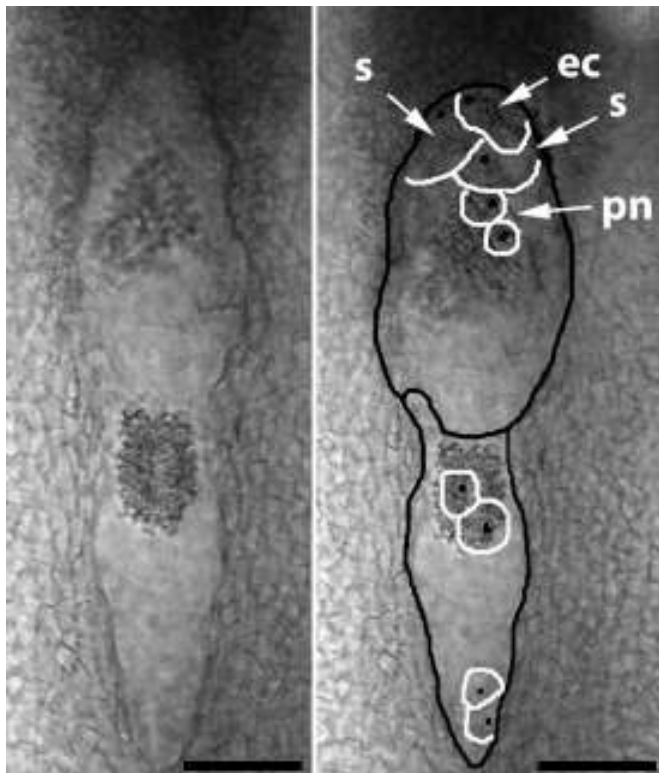


Figura 12. Saco poliembriônico de Quimera glaz encontrado em ovário de 6 mm. O saco sexual contém sinérgides (s), oosfera (ec) e dois núcleos polares (pn). O saco apomítico apresenta quatro núcleos. Barra = 25 μ m.

Tabela 3. Número e porcentagem de sacos embrionários sexuais, poliembriônicos e abortados em óvulos de tipos diploides (UnB 530, 307-1 e Glaz híbrido), triploides (530-5 e 530-19), tetraploides (530-6, 530-7, 530-9, 530-10, 530-11, 530-12, 530-15, 530-20, 530-21, 53-22, 530-23, 530-24, 530-25, 530-26, 530-27, 530-28, 530-29, 530-34, 530-35, 530-36, 530-37) e quimeras de mandioca (UnB 530p e Quimera glaz).

Amostras	Sexuais		Sacos poliembriônicos		Abortados		Total
	Número	%	Número	%	Número	%	
UnB 530	293	97.7	0	0	7	2.3	300
UnB 530p	274	91.3	4	1.3	15	5.0	300
530-05	10	24.4	0	0	31	75.6	41
530-06	29	96.7	0	0	1	3.3	30
530-07	28	93.3	0	0	2	6.7	30
530-09	29	96.7	0	0	1	3.3	30
530-10	27	90,0	0	0	3	10.0	30
530-11	27	90.0	0	0	3	10.0	30
530-12	29	96.7	0	0	1	3.3	30
530-15	29	96.7	0	0	1	3.3	30
530-18	30	100.0	0	0	0	0	30
530-19	10	16.7	0	0	50	83.3	60
530-20	27	90.0	0	0	3	10.0	30
530-21	28	93.3	0	0	2	6.7	30
530-22	29	96.7	0	0	1	3.3	30
530-23	29	96.7	0	0	1	3.3	30
530-24	29	96.7	0	0	1	3.3	30
530-25	30	100.0	0	0	0	0	30
530-26	29	96.7	0	0	1	3.3	30
530-27	27	90.0	0	0	3	10.0	30
530-28	26	86.7	0	0	4	13.3	30
530-29	30	100.0	0	0	0	0	30
530-34	30	100.0	0	0	0	0	30
530-35	28	93.3	0	0	2	6.7	30
530-36	28	93.3	0	0	2	6.7	30
530-37	29	96.7	0	0	1	3.3	30
307-1	60	90.9	0	0	6	9.1	66
Glaz híbrido	5	25.0	0	0	5	25.0	20
Quimera glaz	54	90.0	2	3.3	4	6.7	60

Produção de raízes

Raízes de cultivares de mandioca (Figura 13) dos tipos diploide, triploide e quimeral formaram cilindros alongados, variando levemente em número, mas com desempenho excepcional na produtividade do tipo quimeral, que exibiu peso cinco vezes maior que o diploide (Tabela 4).

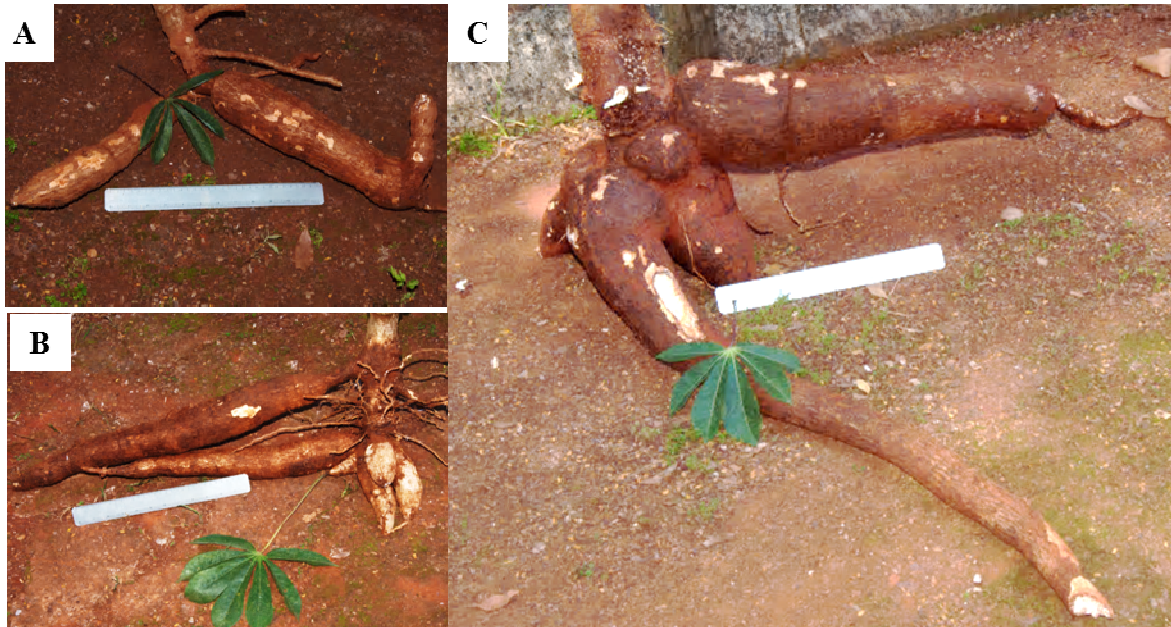


Figura 13. Raízes comestíveis de tipos com ploidias distintas de mandioca. A. UnB 530 (diploide). B. 530-19 (triploide). C. UnB 530p (Quimera).

Tabela 4. Média do número e peso de raízes de cultivares de mandioca. Diploide (UnB 530 – 3 indivíduos), triploide (530-19 – 2 indivíduos), tetraploide (530-36 – 2 indivíduos) quimera (UnB 530p – 3 indivíduos).

Amostra	Número de raízes	Peso (kg)
UnB 530	2	2,5
UnB 530p	4	12
530-19	6	3,5
530-36	5	2,8

Discussão

Estudos com citoquimeras são frequentemente relacionados à tratamentos de poliploidização com colchicina (Dermen e Bain, 1944). Mais recentemente, a identificação histogênica de plantas tratadas com colchicina de *Hemerocallis* (Podwyszyńska et al., 2008), *Vaccinium* (Chavez e Lyrene, 2009) e *Magnolia* (Parris et al., 2010) conduziram à caracterização morfo-anatômica de ápices meristemáticos e órgãos. Apesar de essas investigações corroborarem com dados botânicos de outras espécies, a elucidação de sua função com propósito de melhoramento precisa ser desenvolvido.

A aplicação de colchicina em gemas laterais de cultivares e híbridos interespecíficos de mandioca avaliados neste estudo, com subsequente propagação vegetativa, gerou citoquimeras. A comprovação da estrutura quimeral baseou-se em critérios anatômicos, morfológicos e citogenéticos. Em relação à anatomia dos ápices meristemáticos caulinares, o aumento no tamanho das células nas camadas L1 e L2 de UnB 530p, Quimera 307-1 e Quimera glaz foi significativo, especialmente em Quimera glaz, na qual a variação de valores foi maior. Desta maneira, foi possível identificar quimeras dentre as plantas, em que L1 e L2 apresentaram células poliploidizadas. O tamanho das células no ápice meristemático foi utilizado como indicador de ploidia de camadas em outras espécies (Laufs et al., 1998; Burge et al., 2002).

O tamanho dos estômatos foi um indicador útil na avaliação inicial do nível de ploidia da camada L1 das plantas citoquimerais. Esta característica foi notadamente aumentada em UnB 530p, Quimera 307-1 e Quimera glaz, confirmando sua configuração poliploide, assim como nos triploides 530-5 e 530-19. A relação direta de aumento de ploidia e incremento no tamanho do estômato também foi relatado para *Citrus* (Yahata et al., 2005) e *Acacia* (Harbard et al., 2012). A densidade estomática diminuiu em Quimera 307-1 e Glaz híbrido. Resultado semelhante foi observado em *Platanus* (Liu et al., 2007) e *Spatiphyllum* (Laere et al., 2011). Diferentemente do comprimento, a densidade estomática não constituiu preditor útil de variação de nível de ploidia, por ela variar mesmo dentre indivíduos com ploidias distintas numa

mesma espécie (Rupp et al., 2010). Por essa razão, densidade estomática não foi útil para a predição de ploidia da camada L1 em UnB 530, UnB 530p e sua progênie.

Múltiplos conjuntos cromossômicos gerados pela poliploidização de L2 influenciaram os processos meióticos em todas as citoquimeras e poliploides totais deste estudo. De fato, a formação de gametas é geralmente atribuída à camada L2 (Fletcher, 2002). As cultivares diploides UnB 530 e 307-1, produziram citoquimeras com comportamentos citogenéticos semelhantes; UnB 530p teve um decréscimo geral na fertilidade, viabilidade de pólen e regularidade de micrósporos, enquanto Quimera 307-1 apresentou completa inibição de florescimento.

Por outro lado, a composição poliploide de Quimera glaz restaurou a fertilidade do híbrido, aumentando os parâmetros descritos acima. A esterilidade vegetal é relacionada à incompatibilidade em tipos diploides (Benavente et al., 2008), sendo este provavelmente o caso de Glaz híbrido. As associações multivalentes estão envolvidas com a baixa fertilidade (Grandont et al., 2013), fato observado na citoquimera UnB 530p e nos poliploides totais 530-19 e 530-36. A completa esterilidade tem sido relatada em algumas quimeras vegetais (Wang et al., 2010). Isto pode ser atribuído à regulação epigenética (Rodrigues and Koltunow, 2005) ou pelo efeito aditivo da poliploidia, causando ausência de florescimento em Quimera 307-1.

Enquanto a viabilidade do pólen permitiu o reconhecimento da camada L2 em diploides, triploides e poliploides dentre as plantas deste estudo, assim também o tamanho do grão auxiliou nessa determinação. No diploide 530-18, e em outros triploides e tetraploides totais que foram estabelecidos por sementes, a viabilidade de pólen e o tamanho do grão oferecem um modo confiável e rápido para a detecção da ploidia da camada L2.

A contagem e as configurações cromossômicas de botões masculinos e pontas de raízes indicaram diretamente a composição de L2 e L3 nas citoquimeras e nos poliploides totais. As cultivares UnB 530 e 307-1 apresentaram número e configuração regulares nas plantas diploides, de acordo com sua também regular formação de tétrades. Por outro lado, a constituição quimeral de UnB 530p levou à ocorrência de multivalentes, além

do decréscimo na regularidade da formação de micrósporos. Outro dado interessante é a alta frequência de díades e tétrades com micronúcleo em Glaz híbrido, caracterizando a natureza híbrida do diploide. A citoquimera Quimera glaz, oportunamente, teve alta regularidade de microspores de acordo com o pareamento cromossômico (Comai, 2005). A partir dessas evidências citogenéticas, os diploides totais (UnB 530, 530-18, 307-1 e Glaz híbrido), triploides totais (530-5 e 530-19), tetraploides totais (530-6, 530-7, 530-9, 530-10, 530-11, 530-12, 530-15, 530-20, 530-21, 53-22, 530-23, 530-24, 530-25, 530-26, 530-27, 530-28, 530-29, 530-34, 530-35, 530-36, 530-37) e citoquimeras $4n-4n-2n$ (UnB 530p, Quimera 307-1 e Quimera glaz) puderam ser identificadas.

As irregularidades meióticas observadas nos poliploides totais, híbridos e nas citoquimeras estão potencialmente relacionadas à ocorrência de sacos embrionários abortados nos triploides e em Glaz híbrido. Os sacos poliembriônicos detectados nas amostras poliploidizados de UnB 530p e Quimera glaz foram provavelmente causados pela duplicação genética de L2. Apesar de a formação gamética ser atribuída a L2, existe evidência de que L1 também pode estar envolvida na formação do saco apomítico (Koltunow and Grossniklaus, 2003). A relação entre ploidia e baixas frequências de sacos poliembriônicos na mandioca tem sido relatada (Nassar et al., 2010; Freitas e Nassar, 2013).

Apesar de alguns trabalhos atribuírem a poliploidia ao aumento na frequência de sacos poliembriônicos (apomixia), isso não foi observado na progênie da planta citoquimeral. Isso sugere que genes recessivos controlam essa característica em *Manihot* (Nassar, 2002; Nassar et al., 2009).

Os resultados mitóticos revelaram a natureza diploide da camada L3 de Quimera 307-1 e Quimera glaz. Como as raízes são derivadas da camada mais interna, rastreou-se esta camada pelo exame anatômico dos ápices meristemáticos de UnB 530p, confirmando sua constituição quimeral da camada L3 diploide.

A produção de raízes nas plantas quimerais foi aparentemente maior em comparação com os triploides e tetraploides totais. Isso pode estar possivelmente relacionado ao efeito epigenético na citoquimera (Szymkowiak e

Sussex, 1996). As alterações morfogenéticas podem ter ocorrido nas plantas citoquimerais de mandioca, apoiando a hipótese da influência epigenética nas diferentes camadas geneticamente diferentes. A coexistência de diversos níveis de ploidia em L1, L2 e L3 nas plantas citoquimerais podem ter criado um ambiente favorável para o aumento na produção das raízes. As interações epigenéticas também levaram possivelmente à inibição no florescimento de Quimera 307-1, à ocorrência de sacos poliembriônicos em UnB 530p e Quimera glaz.

Agradecimentos

Nós somos gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de doutorado do autor júnior (DYHF) e ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ao pesquisador sênior (NMAN). A Coleção Viva de *Manihot* mencionada foi estabelecida na Universidade de Brasília na década de 1970, com o apoio do Centro Internacional de Pesquisa Canadense (IDRC), ao qual somos agradecidos.

Referências

- Benavente E, Cifuentes M, Dusautoir JC, et al. (2008). The use of cytogenetic tools for studies in the crop-to-wild gene transfer scenario. *Cytogenet. Genome Res.* 120:384–95.
- Burge GK, Morgan ER and Seelye JF (2002). Opportunities for synthetic plant chimeral breeding: Past and future. *Plant Cell Tiss. Org.* 70:13–21.
- Carvalho R and Guerra M (2002). Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas* 136:159–68.
- Ceballos H, Iglesias CA, Pérez JC, et al. (2004). Cassava breeding: opportunities and challenges. *Plant Mol. Biol.* 56:503–16.

- Chavez DJ and Lyrene PM (2009). Production and identification of colchicine-derived tetraploid *Vaccinium darrowii* and its use in breeding. *J. A. Soc. Hortic. Sci.* 134:356–363.
- Comai L (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature* 6:836–46.
- Dermen H and Bain HF (1944). A general cytohistological study of colchicine polyploidy in cranberry. *Am. J. Bot.* 31:451–463.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2013). Cassava: a guide to sustainable production intensification. Rome.
- Fletcher JC (2002). Shoot and floral meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:45–66.
- Freitas, DYH and Nassar NMA (2013). Apomixis in cassava: advances and challenges. *Genet. Mol. Res.* 12:988–994.
- Gomes PTC and Nassar NMA (2013). Cassava interspecific hybrids with increased protein content and improved amino acid profiles. *Genet. Mol. Res.* 12: 1214-1222.
- Grandont L, Jenczewski E and Lloyd A (2013). Meiosis and its deviations in polyploid plants. *Cytogenet. Genome Res.* 140: 171-184.
- Hahn SK, Bai K and Asiedu R (1990). Tetraploids, triploids, and 2n pollen from diploid interspecific crosses with cassava. *J. A. Soc. Hortic. Sci.* 433–439.
- Harbard JL, Griffin a. R, Foster S, et al. (2012). Production of colchicine-induced autotetraploids as a basis for sterility breeding in *Acacia mangium* Willd. *Forestry* 85:427–436.
- Koltunow AM and Grossniklaus U (2003). Apomixis: a developmental perspective. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:547–74.
- Kraus JE and Arduin M (1997). Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica, Rio de Janeiro. Brasil.
- Laere K, França SC, Vansteenkiste H, et al. (2011). Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. *Acta Physiol. Plant.* 33:1149–1156.
- Laufs P, Grandjean O, Jonak C, et al. (1998). Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1375–90.

- Liu G, Li Z and Bao M (2007). Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica* 157:145–154.
- Marcotrigiano M, Bernatzky R (1995) Arrangement of cell layers in the shoot apical meristems of periclinal chimeras influences cell fate. *The Plant Journal* 7:193–202.
- Nassar NMA (1978). Chromosome number and meiotic behaviour of some wild *Manihot* species native to Central Brazil. *Braz. J. Genet.* 1: 51-57.
- Nassar NMA (2002). Apomixis and Cassava. *Genet. Mol. Res.*1: 147-152, 2002.
- Nassar NMA (2003). Fertility and chimera induction in cassava interspecific hybrids. *Gene Conserve* 2: 117-123.
- Nassar NMA and Ortiz R (2008). Cassava genetic resources: manipulation for crop improvement. *Plant Breeding Rev.* 31: 247-275.
- Nassar NMA, Gomes PTC, Chaib AM, et al. (2009). Cytogenetic and molecular analysis of an apomictic cassava hybrid and its progeny. *Genet. Mol. Res.*8: 1323-1330.
- Nassar NMA, Hashimoto DYC and Graciano-Ribeiro (2010). Genetic, embryonic and anatomical study of an interspecific cassava hybrid. *Genet. Mol. Res.*9: 532-538.
- Nassar NMA, Hashimoto-Freitas, DY, Mendoza, M, et al. (2012). Some interesting cassava cultivars 11: UnB 530p. *Gene Conserve* 11: 7-10.
- Paiva JGA, Fank-de-Carvalho SM, Magalhaes MP, et al. (2006). Verniz vitral 500: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Bot. Bras.* 20: 257–264.
- Parris JK, Ranney TG and Baird WV (2010). Ploidy Levels, Relative Genome Sizes, and Base Pair Composition in *Magnolia*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 135:533–547.
- Podwyszyńska M, Gabryszewska E, Sochacki D, et al. (2008). Histogenic identification by cytological analysis of colchicine-induced polyploids of *Hemerocallis*. *Acta Hort.* 886:245–249.
- Rodrigues JCM and Koltunow AMG (2005). Epigenetic aspects of sexual and asexual seed development. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 47: 37–49.

- Rupp B, Samuel R, Russell A, et al. (2010). Genome size in *Polystachya* (Orchidaceae) and its relationships to epidermal characters. *J. Linn. Soc.* 163:223–233.
- Sreekumari MT, Abraham K and Nair SG (2000). Triploidy breeding in cassava. Central Tuber Crops Research Institute (Indian Council of Agricultural Research), Thiruvananthapuram, Kerala, India.
- Szymkowiak EJ and Sussex IM (1996). What Chimeras Can Tell Us About Plant Development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:351–376.
- Wang Y, Cheng Q, Zhu X-Y, et al. (2010). Studies on reproductive characteristics of an interspecific chimera between *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. *Plant Cell Tiss. Org.* 104:209–215.
- Yahata M, Kunitake H, Yabuya T, et al. (2005). Production of a doubled haploid from a haploid pummelo using colchicine treatment of axillary shoot buds. *J. A. Soc. Hortic. Sci.* 130:899–903.
- Young BA, Sherwood RT and Bashaw E (1979). Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Can. J. Bot.* 57:1668–1672.
- Zhu X-Y, Zhao M, Ma S, et al. (2007). Induction and origin of adventitious shoots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. *Plant Cell Rep.* 26:1727–32.

Capítulo 3

Ontogenia do saco embrionário de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com diferentes ploidias

Resumo

A viabilidade das sementes é coordenada nas espécies sexuais ao longo da formação e do desenvolvimento do embrião. Processos assexuais tomam lugar quando desvios na sequência de desenvolvimento da reprodução sexual acontecem, mecanismo este trazido pela seleção natural para a sobrevivência das espécies. Em mandioca, isso tem importância especial, pois a propagação vegetativa de sementes pela apomixia evita a contaminação por patógenos e fornece o vigor híbrido por diversas gerações. Neste estudo, nós objetivamos o delineamento ontogenético do saco embrionário em mandioca para determinar pontos específicos onde ocorrem os desvios da reprodução sexual. Para fornecer a cronologia nos processos de megasporogênese e megagametogênese, uma análise comparativa foi empregada com tipos diploides e quimerais, usando técnicas de clareamento e seccionamento. Nossos dados confirmam o saco sexual do tipo Polygonum para ambas as ploidias. A poliploidização da camada L2 na planta quimeral resultou em aumento no tamanho das estruturas florais; além disso, ela incrementou a frequência de sacos poliembriônicos. Este é o primeiro relato sobre a ontogenia do saco embrionário em quimera de mandioca.

Palavras-chave:

Apomixia, citoquimera, saco poliembriônico, proembrião.

Embryo sac ontogeny of different ploidy levels in cassava

Abstract

Viability of seeds is coordinated in sexual species by embryo formation and its development. Asexual pathways take place when deviations of sexual sequence of development occur, as a mechanism brought by natural selection for species survival. In cassava, it has a special importance because clonal seeds propagation by apomixis avoids pathogens contamination and provides hybrid vigor through generations. In this study, we aimed to trace cassava embryo sac ontogeny in order to point out specific stages where deviations of the sexual development occur. To provide the chronology of megasporogenesis and megagametogenesis, a comparative analysis was carried out on diploid and cytochimeric types, using clearing and sectioning techniques. Our data show the Polygonum type for sexual embryo sac of both diploid and chimeric individuals. Polyploidy of L2 in chimeric plant resulted in enlargement of embryo sacs; moreover, it increased polyembryo sacs frequency. This is the first report dealing with chimeric cassava embryo sac ontogeny.

Keywords:

Apomixis, cytochimera, polyembryo sac, pro-embryo.

Introdução

Manihot esculenta Crantz (mandioca) é a única espécie cultivada dentre 98 incluídas no gênero *Manihot* (Rogers e Appan 1973). Sua cultura ocupa a quarta posição entre as fontes de energia humana mais consumidas no mundo, atrás do arroz, milho e cana-de-açúcar (FAO 2008). Seu grande potencial agrícola promoveu o recente título de cultura mais promissora do século (FAO 2013).

A espécie pertence à família Euphorbiaceae e tribo Crotonoideae (Webster 1994). Alguns gêneros desta família, como *Ricinus* L., *Hevea* Aublet, *Jatropha* L. e *Euphorbia* L. têm sido investigados em termos embriológicos, e o número de núcleos nos sacos embrionários varia de oito, em *Euphorbia*, a 16, em sacos de *Acalypha* L. (Kapil e Bhatnagar 1994). Mais recentemente, uma demonstração do desenvolvimento floral em cultivares de mandioca forneceu um entendimento básico do gametófito feminino (Perera et al. 2012), entretanto, a ontogenia do saco embrionário ainda carecia de informações.

Os desvios na reprodução sexual têm recebido atenção, como a apomixia, que tem sido considerada uma ferramenta importante no melhoramento de culturas (Barcaccia e Albertini 2013), especialmente em mandioca (Nassar e Ortiz 2010; Nassar et al. 2011). Através do processo de poliploidização, poliploides totais e parciais – denominados citoquimeras – têm sido produzidos (Marcotrigiano e Gradziel 1997; Nassar 2003). Poliploides totais têm relação bem conhecida com a poliploidia (Carman 1997; Nassar et al. 2010); entretanto, desvios sexuais em plantas citoquiméricas ainda não foram relatados. Dados escassos sobre a ontogenia reprodutiva em mandioca e sua relação com mecanismos apomíticos motivaram este estudo.

Material e métodos

Material vegetal

Uma cultivar indígena diploide, denominada UnB 530, e seu tipo quimeral $4n-4n-2n$, denominado UnB 530p (Nassar et al. 2012), obtido por aplicação de colchicina nas gemas laterais de UnB 530, foram as plantas fontes para as coletas de flores femininas avaliadas neste estudo.

Essas plantas encontram-se na Coleção Viva de *Manihot* na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

Técnica de clareamento

Flores femininas com comprimento de ovários medindo entre 0,5-7 mm (Fig. 1) foram coletadas de UnB 530 e UnB 530p. Elas foram fixadas em Carnoy I por 14 dias, conservadas em etanol 70%, dissecadas, clarificadas em metil salicilato (Young et al. 1979) e observadas em microscopia de contraste interferencial. A organização do saco embrionário e a quantidade de núcleos foram observadas nos diversos estágios do desenvolvimento.



Fig. 1 Flores femininas de *Manihot esculenta* em estágios sequenciais de desenvolvimento (1-10).

Técnica de seccionamento

Óvulos da planta diploide e do tipo quimeral com o mesmo intervalo de tamanho de ovário citado acima foram incluídos em Resina de Spurr (Spurr 1969) e corados com azul de toluidina. Alguns foram incluídos em parafina (Kraus e Arduin 1997), corados com safranina/verde firme e montados em

resina sintética (Paiva et al. 2006). Os óvulos foram seccionados longitudinalmente em micrótomo Leica RM 2145 com espessura variando entre 3-5 μm . Sacos embrionários apomíticos previamente observados pela técnica de clareamento foram incluídos em parafina a partir de uma série de acetona (Young et al. 1979), seccionados e corados como descrito acima.

Todas as imagens foram captadas em microscópio de luz Leica DM 2500 e Zeiss Axioscop 2, e processadas nos softwares Leica Application Suite 4.0 ou Photoshop CS4. Composições foram criadas para a visualização da estrutura completa do saco embrionário.

Resultados

Óvulos clarificados (Fig. 2) e seccionados (Fig. 3) mostraram os mesmos resultados em termos de desenvolvimento do saco embrionário (Fig. 4) dentre 1361 amostras dos tipos diploide e quimeral de mandioca. Os estágios foram numerados de 1-10, correspondendo à sequência de desenvolvimento a partir da célula mãe do megásporo (CMM) até proembrião.

UnB 530 revelou a célula inicial e as tétrades no formato de “T” em ovários nos estágios 1, 2 e 3 (Fig. 2a-c, Fig. 3a-c). No estágio 4, com flores coletadas fechadas (Fig. 2d, Fig. 3d), notaram-se o megásporo selecionado e a degeneração das tríades; o tecido nucelar, além dos tegumentos interno e externo estavam presentes e já diferenciados. No estágio seguinte (Fig. 2e, Fig. 3e), dois núcleos foram vistos migrando para os pólos opostos do saco. No estágio 6 (Fig. 2f, Fig. 3f), quatro núcleos foram observados. Ovários com 4mm de comprimento (Fig. 2g, Fig. 3g) em diante foram coletados de flores abertas; nesse estágio, o saco embrionário encontrou-se maduro, com uma oosfera, duas sinérgides e dois núcleos polares; as antípodas eram ocasionalmente vistas neste estágio. Os núcleos polares encontravam-se frequentemente próximos ao aparato oosfera-sinérgides. A presença de endosperma foi observada a partir deste ponto até estágios posteriores, com núcleos livres dispersos em redes ao longo da periferia do saco embrionário. No estágio 8

(Fig. 2h, Fig. 3h) foi possível visualizar proembriões e formação de endosperma. Em ovários com 6-7 mm (Fig. 2i, Fig. 3i), o contínuo desenvolvimento do embrião foi observado, assim como a densificação do endosperma em sacos com embrião em desenvolvimento. Grãos de amido foram notados desde as divisões mitóticas iniciais até o estágio do saco embrionário maduro.

O tipo quimeral, UnB 530p, apresentou CMM no estágio 1, em ovários com 0,8 mm de comprimento (Fig. 2j). Os tegumentos interno e externo, assim como o nucelo já estavam presentes e em diferenciação. No estágio 2 (Fig. 2k), a fase de díades foi caracterizada por divisões anticlinais; no estágio 3 (Fig. 2l) foi possível encontrar tétrades algumas vezes em orientação linear, outras em arranjo de "T". No estágio 4 (Fig. 2m), o megásporo selecionado foi evidenciado em ovários com 2 mm de comprimento. O estágio 5 (Fig. 2n) foi marcado pela presença de duas células com núcleos proeminentes. No estágio 6 (Fig. 2o) foram observados quatro núcleos em migração para os pólos. Ovários com 5 mm de comprimento foram coletados de flores já abertas, e nesse caso, a oosfera, duas sinérgides, dois núcleos polares e eventualmente três antípodas foram notados (Fig. 2p).

Proembriões e endosperma foram observados em ovários com 6-7 mm de comprimento (Fig. 2q-r). Em relação ao desenvolvimento do endosperma, ele seguiu o padrão revelado no tipo diploide, com núcleos livres organizados em uma rede ao longo da parede do saco embrionário.

O proembrião, em ambos os tipos, tinha um formato alongado com pelo menos uma divisão anticlinal iniciando o desenvolvimento; o número de núcleos nos estágios mais jovens de desenvolvimento do embrião variou de 2-4. O tubo polínico não foi encontrado nos óvulos analisados neste estudo.

Sacos poliembriionários foram observados em UnB 530p, dentre ovários com 6 mm de comprimento, e conseqüentemente de flores abertas. Dois sacos foram vistos nos referidos óvulos, numa frequência de 1,3%. Os sacos com localização calazal continham quatro núcleos, enquanto os micropilares estavam compostos por seis núcleos, apresentando certo grau de degeneração

Citoquimeras e poliploides em mandioca: citogenética, anatomia e ontogenia do saco embrionário.

(Fig. 5). Em cortes dos sacos poliembrionários, a parede que delimitava as estruturas pareceu estar danificada pelo tratamento de inclusão.

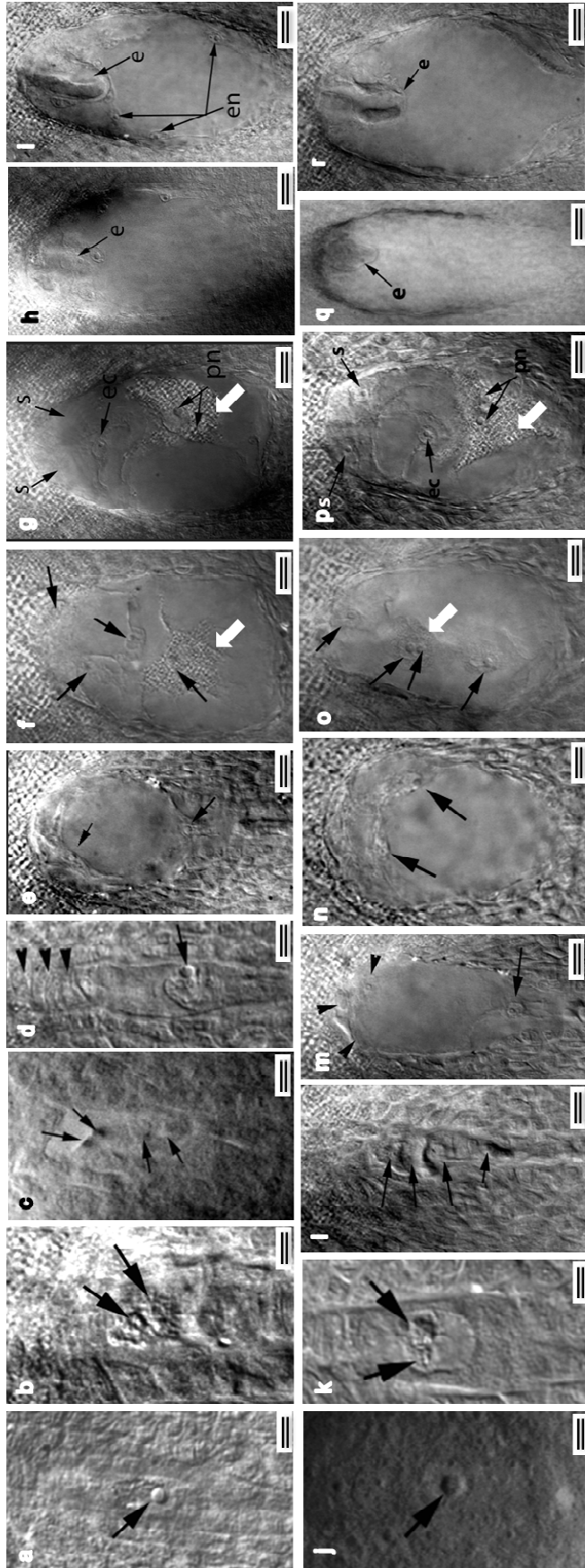


Fig. 2 Desenvolvimento do saco embrionário dos tipos diploide - UnB 530 (a-i) - e citoquimeral - UnB 530p (j-r) - de *Manihot esculenta*. a, j. CMM (seta). b, k. Estágio de díades. c, l. Estágio de tétrades. d, m. Megásporo selecionado (seta) e tríades em degeneração (cabeças de setas). e, n. Dois núcleos (setas) após a primeira divisão mitótica. f, o. Quatro núcleos (setas) após a segunda divisão mitótica. g, p. Saco embrionário maduro com duas sinérgidas (s), uma oosfera (ec) e dois núcleos polares (pn). h, q. Proembrião uninucleado. i, r. Proembrião binucleado. s = sinérgida; ec = oosfera; pn = núcleo polar; ps = proembrião; e = endosperma. Barra = 25 µm (a-d e j-l); 50 µm (e-g e m-p); 100 µm (h-l e q-r).

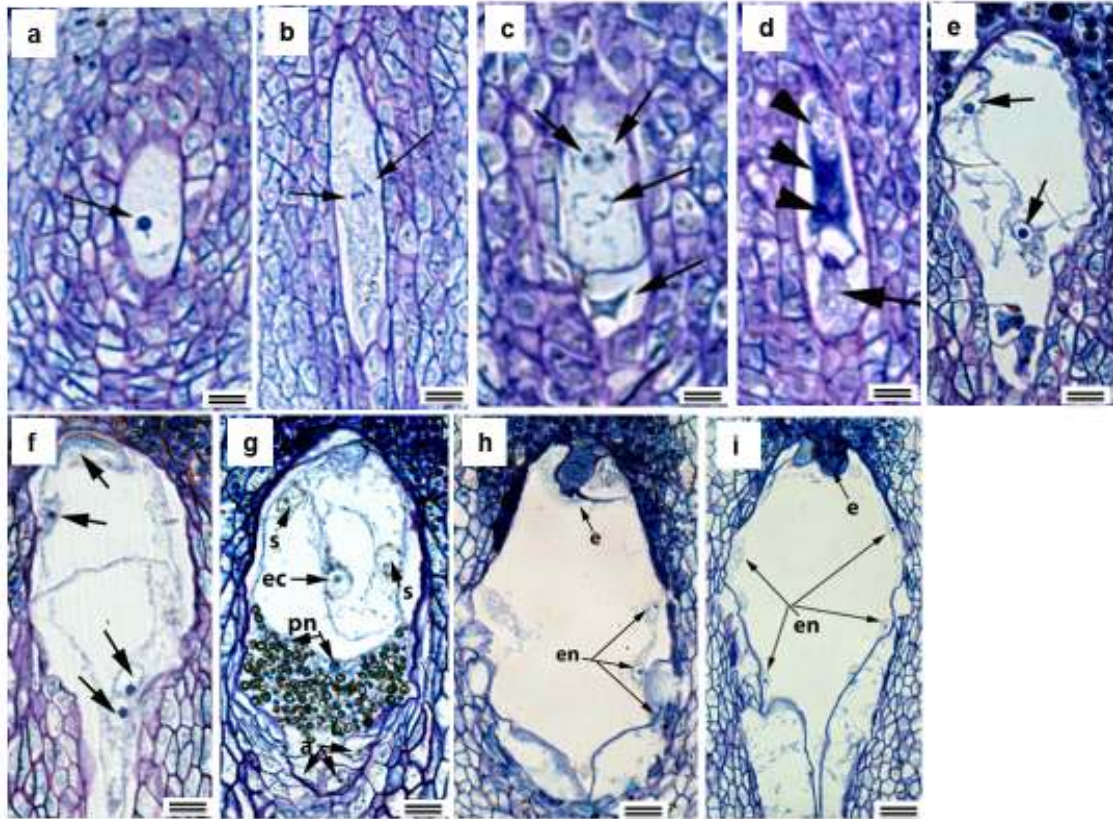


Fig. 3 Cortes de sacos embrionários mostrando o desenvolvimento em óvulo de *Manihot esculenta*. **a.** CMM (seta). **b.** Estágio de díade. **c.** Estágio de tétrade. **d.** Megásporo selecionado (seta) e tríades degenerando (cabeças de setas). **e.** Dois núcleos (setas) após a primeira mitose. **f.** Quatro núcleos (setas) após a segunda mitose. **g.** Saco maduro com duas sinérgides (s), oosfera (ec), dois núcleos polares (pn) e três antípodas (a). **h. i.** Proembrião. Pólo micropilar na porção superior. e= proembrião. en= endosperma. Barra 25 μm (**a-d**); 50 μm (**e-h**); 100 μm (**i-j**).

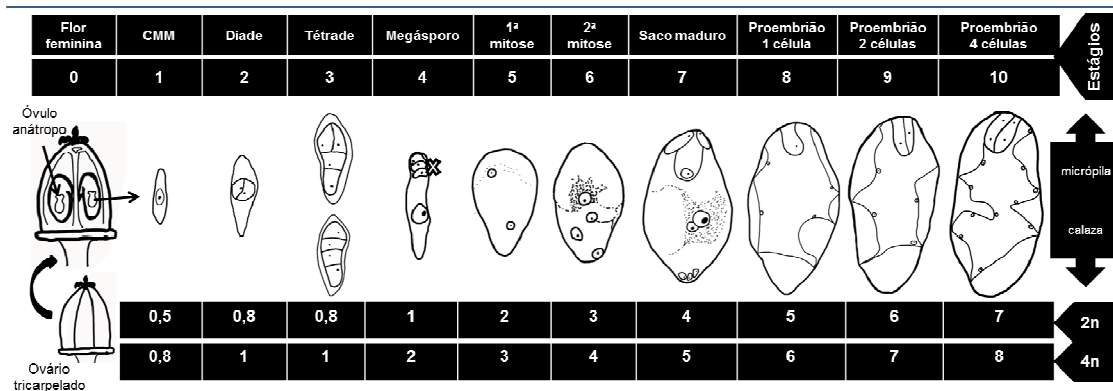


Fig. 4 Esquema do desenvolvimento do saco embrionário em *Manihot esculenta*. Note os arranjos linear e em “T” das tétrades no estágio 3 e o progressivo aumento no volume do saco. Ocorrência dos grãos de amido entre os estágios 5-7. Valores na porção inferior referem-se ao comprimento do ovário em mm do tipo diploide (2n) e do quimeral (4n).

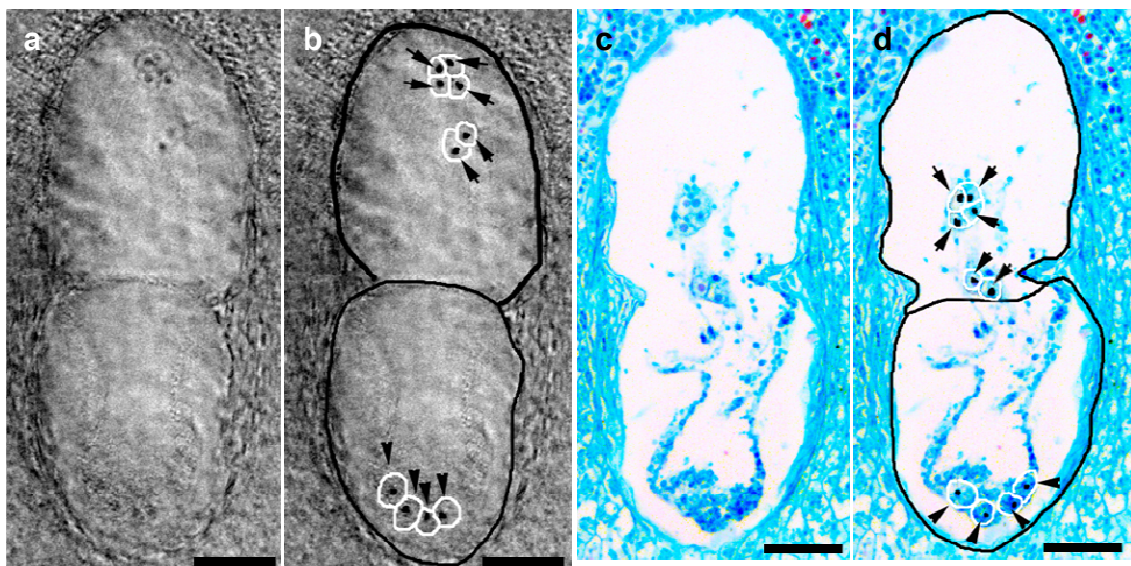


Fig. 5 Sacos poliembriônicos em um óvulo do tipo quimeral de *Manihot esculenta* (UnB 530p) pela técnica de clareamento (a-b) e seccionamento (c-d). b e d representam esquemas de a e c, respectivamente. Note seis núcleos (setas) no saco micropilar e quatro núcleos degenerando no pólo calazal (cabeças de setas). Barra = 25 µm.

Discussão

Megaesporogênese e megagametogênese

O desenvolvimento do saco embrionário em mandioca é monospórico, evidenciado pela ocorrência de um único megásporo selecionado dentre tétrades no estágio 4, que passa por divisões mitóticas até a formação de um saco com oito núcleos. O saco maduro, tanto no tipo diploide quanto no quimeral, é composto por oito núcleos, similarmente ao que é relatado em outras plantas cultivadas de mandioca (Rao e Rao 1976; Perera et al. 2012).

A megaesporogênese segue pelo estágio de díade com células lado a lado horizontalmente, e tétrades com configuração linear ou em forma de “T”. O último tipo foi relatado em uma cultivar de mandioca previamente (Rao e Rao 1976). O megásporo próximo à calaza aumenta de volume antes da mitose e os três esporos não funcionais degeneram, assim como acontece em *Zea L.* (Wu et al 2011) e *Ambrosia L.* (Chen et al. 2013).

Três divisões mitóticas e migração dos núcleos são característicos da megagametogênese em mandioca, similarmente ao que foi relatado por Kägi e Groß-Hardt (2007) em trabalhos com *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., como segue: após a primeira mitose, cada um dos núcleos migra para os pólos micropilar e calazal; dois grupos de duas células são gerados em cada pólo após a segunda divisão mitótica; após a terceira divisão, um núcleo de cada pólo migra para a região central do saco. Durante a formação do megagametófito, um eixo polarizado micrópila-calaza é gerado, e a diferenciação celular leva à especialização da oosfera e das sinérgides no pólo micropilar, e das antípodas no pólo calazal (Yadegari e Drews 2004). Como em outras dicotiledôneas, o eixo em mandioca pode ser potencialmente gerado por um gradiente de auxina (Zhang e Laux 2011).

Grãos de amido são observados desde o início das divisões mitóticas até a maturação do saco embrionário, sempre associados aos núcleos polares. Uma alta concentração desses grãos na célula média também foi relatada em

Torenia fournieri (Lind.) (Wallwork e Sedgley 2000). As reservas de carboidratos são essenciais para a sobrevivência do embrião, apesar de que o endosperma é o sítio principal para esse acúmulo (Lopes e Larkins 1993). A ocorrência de grãos de amido dentro do saco embrionário é um fenômeno comum em representantes de Cactaceae, Tiliaceae, Asclepiadaceae e Crassulaceae (Maheshwari 1950; López-Fernández e Maldonado 2013).

As antípodas foram vistas ocasionalmente até a maturação do saco embrionário, predizendo sua degeneração anterior à fertilização. Em algumas espécies, como *A. thaliana*, as antípodas morrem imediatamente antes da fertilização, enquanto em outras, como em *Zea*, elas proliferam após a fertilização (Maheshwari 1950; Drews *et al.* 1998). Em Euphorbiaceae, as antípodas parecem persistir após sua formação, como descrito em *Euphorbia preslii* Guss. (Weniger 1917).

As sinérgides estão presentes no saco embrionário maduro da mandioca, assim como as antípodas, e seu desaparecimento está relacionado ao desenvolvimento do embrião. Elas têm um papel importante na fertilização, promovendo o encaminhamento do tubo polínico para a oosfera (Reiser e Fisher 1993). Nas plantas analisadas neste estudo, nem o tubo polínico nem vestígios dele foram detectados. Observações semelhantes foram relatadas para *E. esula* L. (Carmichael e Selbo 1999). Aparentemente, a passagem do tubo polínico em mandioca é rápida e efêmera, sem rastros deixados após a fertilização.

Os núcleos polares notados nas plantas diploide e quimeral são significativamente maiores quando comparados com os outros núcleos do saco embrionário. Essa distinção nas dimensões dos núcleos polares também foi observada em *E. esula*, na qual eles se mantiveram separados até a fertilização (Carmichael e Selbo 1999). Os núcleos polares frequentemente próximos à oosfera e às sinérgides corroboram com a observação de seu fusão nessa localização (Kapil e Bhatnagar 1994).

A formação do endosperma nuclear foi observada desde o saco embrionário maduro até a formação do embrião. Os tipos diploide e quimeral de mandioca têm presumivelmente endospermas triploide e pentaploide,

respectivamente. O tecido triploide exibe desenvolvimento nuclear em estágios mais jovens como descrito para Euphorbiaceae (Kapil e Bhatnagar 1994) e comentado para *E. esula* (Carmichael e Selbo 1999). O endosperma pentaploide surge de uma célula central com quatro núcleos fertilizada por um de origem espermática (Voigt-Zielinski et al 2012). Esses quatro núcleos polares podem ser gerados por anormalidades meióticas ou mitóticas, conduzindo por vezes à apomixia (Koltunow 1993). As plantas deste estudo mostram o mesmo padrão de organização nuclear em estágios mais jovens, que posteriormente desenvolvem-se no tipo celular (Perera et al. 2012).

O proembrião tem formato de dedo em ambos os tipos estudados, aparentemente seguindo a configuração alongada da oosfera. A classificação dos tipos de embrião normalmente considera a primeira divisão periclinal, seguida de sequências de divisões nas células basal e terminal (Maheshwari 1950). Em Euphorbiaceae, o tipo Onagrad é o mais comum; entretanto, Asterad já foi descrito para *E. esula* (Carmichael e Selbo 1999). Aparentemente, a mandioca tem um padrão diferente de divisões nos estágios mais jovens de desenvolvimento do embrião, em que o zigoto se divide anticlinalmente. Esse tipo de divisão foi classificado como anormal por Maheshwari (1950), e relatado para algumas espécies de Loranthaceae (Kuijt 2012), mas nunca para *Manihot*.

Desenvolvimento do saco embrionário, poliploidia e apomixia

As citoquimeras de mandioca com a camada L2 poliploidizada mostraram aumento nos órgãos reprodutivos, fato também comentado para alguns poliploides totais (Fukuhara 2000; Karcz et al. 2000; Fortescue and Turner 2005; Hegarty et al. 2013). O alargamento do óvulo foi acompanhado pela desaceleração no desenvolvimento do saco embrionário. Por isso, quando o saco do tipo diploide estava no estágio do megásporo selecionado com ovários de 1 mm, a planta quimeral estava no estágio de divisão meiótica da célula inicial; em outras palavras, em passos anteriores do desenvolvimento.

A poliploidia está relacionada ao aumento da frequência de apomixia em angiospermas (Carman 1997). Em mandioca, esse caráter foi confirmado por Nassar (2006) e Nassar et al. (2010, 2011). Os tipos apospórico e adventício, além da ocorrência facultativa em baixos níveis são alguns dados sobre a apomixia na espécie (Freitas e Nassar 2013).

Os sacos poliembriônicos na mandioca citoquimeral promoveram a desaceleração no desenvolvimento do saco embrionário. Frequências muito baixas registradas de sacos poliembriônicos podem estar relacionadas a formações anormais diferentes da apomixia. Apesar da mudança reprodutiva do modo sexual para o apomítico em tipos poliploides de mandioca (Nassar et al. 2010), e também as interações epigenéticas relacionadas à apomixia em outras angiospermas (Rodrigues e Koltunow 2005; Grimanelli 2012; Springer 2013), a estrutura citoquimeral não alcançou a dosagem necessária para engatilhar o aumento de apomixia nesses tipos de poliploides parciais.

Agradecimentos

Agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte nos estudos de doutorado do autor júnior (DYHF).

Referências

- Barcaccia, G. and Albertini, E. 2013. Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma. *Plant Reprod.* 1-21. doi: 10.1007/s00497-013-0222-y.
- Carman, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biol. J. Linn. Soc.* **61**:51–94.

- Carmichael, J.S. and Selbo, S.M. 1999. Ovule, embryo sac, embryo, and endosperm development in leafy spurge (*Euphorbia esula*). *Can. J. Bot.* **77**:599–610. doi: 10.1139/cjb-77-4-599.
- Chen, B., Shi, C., Huang, J. et al. 2013. Megasporogenesis, female gametophyte development and embryonic development of *Ambrosia* L. in China. *Plant Syst. Evol.* doi: 10.1007/s00606-013-0872-0.
- Drews, G.N., Lee, D. and Christensen, C.A. 1998. Genetic analysis of female gametophyte development. *Plant Cell* **10**:5–17.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2008. Yearbook. Rome.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2013. Cassava: a guide to sustainable production intensification. Rome.
- Fortescue, J. and Turner, D. 2005. The anatomy of ovule ontogeny of banana, plantain and enset (Musaceae). *Sci. Hortic.* **104**:479–492. doi: 10.1016/j.scienta.2005.01.008.
- Freitas, D.Y.H. and Nassar, N.M.A. 2013. Apomixis in cassava: advances and challenges. *Genet. Mol. Res.* **12**: 988-994. doi: 10.4238/2013.
- Fukuhara, T. 2000. Variation of pollen and ovule parameters among different ploidy levels of *Corydalis* (Fumariaceae). *Plant Syst. Evol.* **224**:1–12.
- Grimanelli, D. 2012. Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**:57–62. doi: 10.1016/j.pbi.2011.10.002.
- Hegarty, M., Coate, J., Sherman-Broyles, S. et al. 2013. Lessons from natural and artificial polyploids in higher plants. *Cytogenet. Genome Res.* **140**:204–25. doi: 10.1159/000353361.
- Kägi, C. and Gross-Hardt, R. 2007. How females become complex: cell differentiation in the gametophyte. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**:633–8. doi: 10.1016/j.pbi.2007.07.011.
- Kapil, A.R.N. and Bhatnagar, A.K. 1994. The contribution of embryology to the systematics of the Euphorbiaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **81**:145–159.

- Karcz, J., Weiss, H. and Maluszyńska, J. 2000. Structural and embryological studies of diploid and tetraploid *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Acta Biol. Cracov. Bot. **42**: 113-124.
- Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. Plant Cell **5**:1425–1437. doi: 10.1105/tpc.5.10.1425.
- Kraus, J.E. and Arduin, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica, Rio de Janeiro.
- Kuijt, J. 2012. Reinstatement and expansion of the genus *Peristethium* (Loranthaceae) 1. Ann. Mo. Bot. Gard. **98**: 542-577. doi.org/10.3417/2010121.
- Lopes, M.A. and Larkins, B.A. 1993. Endosperm origin, development, and function. Plant Cell **5**:1383–99. doi: 10.1105/tpc.5.10.1383.
- López-Fernández, M.P. and Maldonado, S. 2013. Programmed cell death during quinoa perisperm development. J. Exp. Bot. **64**:3313-25. doi: 10.1093/jxb/ert170.
- Maheshwari, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. McGraw-Hill, New York.
- Marcotrigiano, M. and Gradziel, T.M. 1997. Genetic mosaics and plant improvement. Plant Breeding Rev. **15**: 43-84. doi: 10.1002/9780470650097.ch3.
- Nassar, N.M.A. 2003. Fertility and chimera induction in cassava interspecific hybrids. Geneconserve **2**: 117-123.
- Nassar, N.M.A. 2006. Chromosome doubling induces apomixis in a cassava x *Manihot anomala* hybrid. Hereditas **143**: 1-3.
- Nassar, N.M.A. and Ortiz, R. 2010. Breeding cassava to feed the poor. Sci. Am. **302**: 78-84.
- Nassar, N.M., Graciano-Ribeiro, D., Gomes, P.F. et al. 2010. Alterations of reproduction system in a polyploidized cassava interspecific hybrid. Hereditas **147**: 58-61.

- Nassar, N.M.A., Chaib, A.M. and Elsayed, A.Y. 2011. Apomixis in different ploidy levels of cassava. *Hereditas* **148**: 125-128.
- Nassar, N.M.A., Melo, R.G.R., Rodrigues, E.J. et al. 2012. Some interesting cassava cultivars 11: UnB 530p. *Geneconserve* **11**: 7-10.
- Paiva, J.G.A., Fank-de-Carvalho, S.M., Magalhaes, M.P. et al. 2006. Verniz vitral 500: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Bot. Bras.* **20**: 257–264.
- Perera, P.I.P., Quintero, M., Dedicova, B. et al. 2012. Comparative morphology, biology and histology of reproductive development in three lines of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae: Crotonoideae). *AoB plants*. doi: 10.1093/aobpla/pls046.
- Rao, N.P. and Rao, D. 1976. Embryology of cassava. *P. Indian. As-Plant. Sc.* **42B**: 111–116.
- Reiser, L. and Fischer, R.L. 1993 The ovule and the embryo sac. *Plant Cell* **5**:1291–1301. doi: 10.1105/tpc.5.10.1291.
- Rodrigues, J. and Koltunow, A. 2005. Epigenetic aspects of sexual and asexual seed development. *Acta Biol. Cracov. Bot.* **47**:37–49.
- Rogers, D.J. and Appan, S. 1973 *Manihot, Manihotoides*. *Flora Neotropica*. Hafner Press, New York, pp. 272.
- Springer, N.M. 2013. Epigenetics and crop improvement. *Trends Genet.* **29**:241–247. doi: 10.1016/j.tig.2012.10.009.
- Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**: 31-43.
- Voigt-Zielinski, M.L., Piwczynski, M. and Sharbel, T.F. 2012. Differential effects of polyploidy and diploidy on fitness of apomictic *Boechera*. *Plant Reprod.* **25**: 97-109. doi: 1007/s00497-012-0181-8.
- Wallwork, M.A.B. and Sedgley, M. 2000. Early events in the penetration of the embryo sac in *Torenia fournieri* (Lind.). *Ann. Bot.* **85**: 447-454.
- Webster, G.L. 1994. Classification of the Euphorbiaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **3**:3-32.

- Weniger, W. 1917. Development of embryo sac and embryo in *Euphorbia preslii* and *E. spendens*. Bot. Gaz. **63**: 266–281.
- Wu, C., Diggle, P. and Friedman, W. 2011. Female gametophyte development and double fertilization in *Balsas teosinte*, *Zea mays* subsp. *parviglumis* (Poaceae). Plant Reprod. **24**:219–229. doi: 10.1007/s00497-011-0164-1.
- Yadegari, R. and Drews, G.N. 2004. Female gametophyte development. Plant Cell **16**:133–142. doi: 10.1105/tpc.018192.S134.
- Young, B.A., Sherwood, R.T. and Bashaw, E. 1979 Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. Can. J. Bot. **57**:1668–1672.
- Zhang, Z. and Laux, T. 2011. The asymmetric division of the Arabidopsis zygote : from cell polarity to an embryo axis. Plant Reprod. **24**:161–169. doi: 10.1007/s00497-010-0160-x.

Considerações finais

O estudo da mandioca com fins de melhoramento envolve diversas áreas e muitas etapas. O início do processo engloba a obtenção e a seleção de indivíduos fenotipicamente superiores, cabendo a caracterização e o isolamento desses tipos ao uso de ferramentas descritivas e analíticas, encontradas em especial nos campos da botânica, da citogenética e da anatomia.

A manipulação de técnicas como a de poliploidização, com produção de poliploides totais e citoquimeras, tem se mostrado altamente viável para a obtenção de características agronomicamente úteis, como o aumento de produtividade e maior resistência à seca na cultura. Esses fatos, somados à presença de vitaminas, micronutrientes e outros minerais, além do amido, justificam o investimento no estudo para o incremento dessas substâncias na mandioca.

A caracterização ontogênica do saco embrionário da cultura subsidiará a construção do conhecimento acerca da biologia reprodutiva da espécie. Esse dado dará aporte aos estudos sobre apomixia no gênero, no sentido de possibilitar a propagação clonal por sementes em larga escala sem disseminação de doenças. Além disso, ela permitirá a manutenção da extensa variabilidade de *Manihot* em bancos de sementes.