

Marina Therezinha Andreucci Coleman

**Citogenética e Biologia da Reprodução de
Eupatorium Squalidum D C**



1910000375



MARINA THEREZINHA ANDREUCCI COLEMAN

CITOGENÉTICA E BIOLOGIA
DA
REPRODUÇÃO DE *Eupatorium squalidum* DC.

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre em Ge-
nética, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas, Área de
Concentração em Genética, do Ins-
tituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mes-
quita Filho".



T- 375/88

SAO JOSÉ DO RIO PRETO

1987

Este trabalho foi realizado no Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Orientador: Prof. Dr. James Robert Coleman



Este trabalho foi realizado no Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Epatorium aequilidum DC.

Nome vulgar: cambarã-rôxo



Eupatorium squalidum DC.

Nome vulgar: cambará-rôxo

ÍNDICE

	página
I - INTRODUÇÃO.....	1
I.1 - Sobre o gênero <i>Eupatorium</i> : considerações gerais.....	1
I.2 - O fenômeno apomítico.....	3
I.3 - Formação do endosperma e do embrião nas espécies apomíticas.....	9
I.4 - A meiose nas espécies apomíticas.....	12
I.5 - O controle genético do fenômeno apomítico....	15
I.6 - Hibridização, Alogamia, Hábito perene e Poliploidia.....	17
I.7 - Significado evolutivo da apomixia.....	19
I.8 - Apomixia e melhoramento vegetal.....	20
I.9 - Objetivos.....	21
II - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
III - RESULTADOS.....	27
III.1 - Desenvolvimento do gametófito feminino.....	27
III.2 - Desenvolvimento da Microsporogênese.....	36
III.3 - Estudo do Cariótipo.....	50
III.4 - Germinação e Produção de Sementes: Observações de Campo.....	66
IV - DISCUSSÃO.....	70
IV.1 - Estudos Embriológicos.....	70
IV.2 - Estudo da Microsporogênese.....	74
IV.3 - Estudo do Cariótipo.....	78
IV.4 - Germinação e Produção de Sementes; Observações de Campo.....	80
V - RESUMO E CONCLUSÕES.....	82
VI - SUMMARY.....	86
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
APÊNDICE.....	105

I - INTRODUÇÃO

I.1 - Sobre o gênero *Eupatorium*: considerações gerais

O gênero *Eupatorium*, da tribo Eupatorieae, família Compositae, é composto de espécies predominantemente perenes, concentradas nas regiões tropicais das Américas. Compreende cerca de 500 espécies, das quais BAKER (1884) tratou de 151 na Flora Brasiliensis. Apesar de ser um elemento da flora brasileira, o gênero é pouco pesquisado no Brasil, a não ser sob o ponto de vista taxonômico.

GRANT (1953) realizou trabalho citotaxonômico sobre o gênero *Eupatorium* com o objetivo de facilitar a determinação inter e intraespecífica, bem como de obter dados básicos para estudos de hibridização. O autor cita a distribuição do gênero para regiões tropicais e subtropicais com centros de distribuição localizados nas regiões mais quentes da América do Sul e do Norte e menciona 50 a 70 espécies para regiões ao norte do México, 4 nativas da Europa e Ásia e 9 espécies nativas da China. Uma única espécie é citada como endêmica para a África do Sul.

A partir do trabalho de DE CANDOLLE (1836) o gênero foi dividido em três secções e mais tarde ampliado por BENTHAM & HOOKER (1876) para incluir cerca de 12 gêneros previamente descritos. ROBINSON & KING (1980) modificaram o conceito do gênero, reconhecendo novamente vários daqueles que BENTHAM & HOOKER subordinaram ao gênero *Eupatorium* e descreveram outros novos para os quais transferiram muitas das espécies de *Eupatorium*. Como resultado destas modificações, o gênero *Eupatorium*, como reconhecido por ROBINSON & KING, compreende

cerca de 40 espécies, todas nativas do hemisfério norte. As espécies da América do Sul foram distribuídas entre vários gêneros reestabelecidos e novos. De acordo com este sistema (KING & ROBINSON, 1970), *E. squalidum* recebe o nome de *Chromolaena squalida* (DC) KING & ROBINSON. No presente trabalho está sendo seguido o tratamento de BENTHAM & HOOKER, pois consi
dera-se que facilitará a comunicação uma vez que o sistema de ROBINSON & KING não tem sido amplamente aceito.

Números cromossômicos de algumas espécies brasileiras de *Eupatorium* já foram determinados (TURNER & IRWIN, 1960; COLEMAN, 1968, 1970), contudo não incluindo *E. squalidum*. Os números cromossômicos básicos determinados para o gênero são de $x = 10$ e $x = 17$ (DARLINGTON & WYLIE, 1955). O fenômeno da apomixia é bem representado na família Compositae e muitos gêneros e espécies têm sido mencionados com indicação do tipo de apomixia envolvido (GUSTAFFSON, 1946; NYGREN, 1950; FRYXELL, 1957; NOGLER, 1984). Cerca de 15% das espécies da família têm sido estudadas embriologicamente, muitas com indícios de possí
vel apomixia. A incidência de formação de saco embrionário apomítico na família deve ser maior do que os dados indicam, por serem os sacos embrionários apomíticos e sexuais indis
tinguíveis nos seus componentes, quando observados na maturida
de (DAVIS, 1967).

Irregularidades meióticas da microsporogênese e da megasporogênese, com especial atenção ao fenômeno apomítico, foram amplamente estudadas em *E. glandulosum* por HOLMGREEN (1919), tendo demonstrado ser diplospórica autônoma. SPARVOLI (1960) demonstrou diplosporia também em *Eupatorium riparium*.

TURNER & IRWIN (1960) encontraram irregularidades ci
tológicas durante a microsporogênese de uma espécie brasileira

de *Eupatorium*, *E. kleinooides*. Porém, há produção de aquênios bem desenvolvidos apesar de pólen anormal, sugerindo a possibilidade de apomixia.

Na região de São José do Rio Preto (SP) existem várias espécies do gênero *Eupatorium*, sendo algumas delas elementos da flora silvestre e outras invasoras. Duas dessas espécies, *E. bupleurifolium* e *E. callilepis* estudadas quanto a megasporogênese, mostraram-se ser dos tipos apospórico e diplospórico, respectivamente (COLEMAN & COLEMAN, 1984).

A constatação de apomixia em espécies de *Eupatorium* sugere a possível existência de um complexo ou série de complexos apomíticos, tal como existem nos gêneros *Dicanthium* (DE WET & HARLAN, 1970), *Bouteloua* (GOULD & KAPADIA, 1962, 1964), *Calamagrostis* (NYGREN, 1951) e *Townsendia* (BEAMAN, 1957), entre outros.

I.2 - O fenômeno apomítico

Nas Angiospermas a reprodução sexuada implica em dupla fertilização. Um dos núcleos reprodutivos masculinos une-se à oosfera formando o zigoto, o qual dá origem ao embrião, e o outro une-se ao núcleo central, dando origem ao endosperma. A meiose precede a formação dos gametas e a fertilização restaura o número cromossômico somático.

Em muitos grupos de Angiospermas a reprodução sexuada é regularmente combinada ou substituída por um processo de reprodução assexuada, denominada de apomixia (WINKLER, 1908) que na sua definição original, incluiu a reprodução vegetativa por meio de bulbos, bulbilhos, estolões e rizomas. Porém, os



tipos de reprodução vegetativa, embora sejam uma forma de propagação que complementa a reprodução sexuada, não a elimina totalmente. Essencialmente, o importante, são os casos de formação de sementes sem prévia fertilização da oosfera, situação para a qual o termo agamospermia foi introduzido (GUSTAFSSON, 1946; STEBBINS, 1950; NOGLER, 1984), e que atualmente é considerado equivalente ao termo apomixia.

A apomixia leva à descendência que é geneticamente cópia da planta mãe e ocorre fundamentalmente duas maneiras de reprodução: a apomixia gametofítica e a embrionia adventícia.

Na apomixia gametofítica existem duas maneiras de formar o saco embrionário: a diplosporia e a aposporia. Na diplosporia, o saco embrionário se origina da célula mãe dos megásporos através de mitose ou meiose modificada, resultando em um núcleo de restituição. Na aposporia, o saco embrionário não reduzido se origina de célula somática do óvulo, em geral do nucelo. "Apomeiose" é um termo introduzido por RENNER (1916) e cobre ambas, diplosporia e aposporia.

NOGLER (1984) reconheceu 3 tipos de Diplosporia: o tipo Antennária, o tipo Taraxacum e o tipo Ixeris.

O tipo Antennária foi primeiramente descrito por JUEL (1900) em *Antennaria alpina*, em que a célula mãe do megásporo após uma longa intérfase cresce e sofre vacualização, porém não entra em meiose. O próprio megasporócito funciona como megásporo, sofrendo três mitoses que resultam em um saco embrionário com oito núcleos diplóides. Este tipo é amplamente distribuído entre espécies apomíticas dos gêneros *Antennaria* (JUEL, 1900; STEBBINS, 1932), *Hieracium* (BERGMAN, 1941), *Eupatorium* (HOLMGREN, 1919; SPARVOLI, 1960; COLEMAN & COLEMAN, 1984), *Parthenium* (ESAU, 1946), *Calamagrostis* (NYGREN, 1946)

e *Elastotema* (FAGERLIND, 1944), entre outros.

Os tipos *Taraxacum* e *Ixeris* foram descritos por JUEL (1906) e OSAWA (1913). Nestes tipos, a célula mãe do megásporo entra em prófase meiótica, mas devido a assinapse, os univalentes permanecem espalhados sobre o fuso da metáfase I, a placa não se organiza e os cromossomos deixam de migrar para os polos. Na anáfase existem vários retardatários e a membrana nuclear envolve todo o complemento cromossômico em um único núcleo de restituição. Na segunda divisão há formação de uma díade não reduzida, separada por uma parede celular. Em seguida, um dos núcleos da díade, em geral a chalazal, sofre 3 mitoses levando à formação de um saco embrionário com 8 núcleos. Representantes do tipo *Taraxacum* são encontrados entre as Compositae, como nos gêneros *Taraxacum* (OSAWA, 1913; FAGERLIND, 1947; BATTAGLIA, 1950; MALECKA, 1971) e *Erigeron* (HOLMGREN, 1919; FAGERLIND, 1947; BATTAGLIA, 1950) e na espécie *Antennaria carpatica* (BERGMAN, 1951). No tipo *Ixeris* não há a formação de parede entre os dois núcleos não reduzidos e ambos entram na formação do saco embrionário, como em *Ixeris dentata* (OKABE, 1932), *Rudbeckia* (BATTAGLIA, 1946) e *Erigeron* (FAGERLAND, 1947).

A aposporia é a formação de saco embrionário a partir de células somáticas do óvulo, em geral do nucelo. Este tipo de agamospermia, puramente esporofítica, causa frequentemente poliembrionia. As células apospóricas iniciais são reconhecidas pelo aumento do núcleo e do nucléolo. Em aposporia o megasporócito entra em meiose e pode formar megásporos. Porém, uma célula somática, geralmente localizada imediatamente atrás do megasporócito, se transforma em uma célula apospórica que invade o lóbulo nucelar, esmagando os megásporos ou os produtos degenerados de meiose. Uma vez ocupado o lóbulo nucelar,

a célula apospórica sofre 3 divisões mitóticas formando o saco embrionário maduro.

Uma forma peculiar de aposporia ocorre na família *Panicoideae* (Gramineae), na qual o saco embrionário apospórico contém apenas 4 células: uma oosfera, duas sinérgides e um núcleo polar. Assim, nesta família o saco embrionário não reduzido e apomítico se distingue do reduzido e sexuado que tipicamente possui oito núcleos. Nas gramíneas tropicais o aumento de tamanho e a diferenciação das células apospóricas começa geralmente antes do início da meiose (SAVIDAN, 1984).

O tempo de indução da aposporia é decisivo. CHRISTOFF & PAPASOVA (1943) demonstraram, em *Potentilla*, que quando a indução é precoce os sacos embrionários são totalmente apospóricos, enquanto que a indução tardia produz sacos embrionários meióticos em apenas 3% dos óvulos.

A embrionia adventícia parece ser freqüente em plantas de regiões tropicais e subtropicais e caracteriza-se pelo desenvolvimento direto de um embrião a partir de uma célula somática do óvulo, sem a formação de um saco embrionário. Porém, embora o saco embrionário do óvulo não participe da formação do embrião, continua exercendo uma função vital, uma vez que é responsável pela formação do endosperma. A embrionia adventícia é especialmente bem desenvolvida no gênero *Citrus*, sendo também encontrada em certas famílias como *Euphorbiaceae*, *Myrtaceae*, *Liliaceae* e *Orchidaceae*.

Embrionia adventícia é reconhecida como uma forma de apomixia por GUSTAFSSON (1947), STEBBINS (1950), RUTISHAUSER (1954), ASKER (1979), mas não por NOGLER (1984).

Se os descendentes de uma planta tiverem constituição genética exclusivamente de origem materna, tem-se a apomi



xia obrigatória. Entretanto, se os apomíticos retiverem traços de reprodução sexuada, os descendentes formados, além dos maternos, incluirão "aberrantes" em consequência da apomixia ser facultativa. Alguns pesquisadores da área acreditam que a apomixia completamente obrigatória não existe, pois o conceito / de apomixia, como um sistema genético vegetal de equilíbrio estratégico entre reprodução sexuada e assexuada, está tendo cada vez mais adeptos (ORNDUFF, 1970; ASKER, 1984; NOGLER, 1984).

Casos esporádicos de desenvolvimento partenogenético ocorrendo independentemente da não redução, são mencionados na literatura (MAHESHWARI, 1950), sob a designação de apomixia não-recorrente, que resulta na formação de embriões haplóides. As primeiras plantas haplóides foram encontradas em *Datura* (BLAKESLEE *et alii*, 1922). Posteriormente JORGENSEN (1928), num trabalho clássico, realizou cruzamentos entre *Solanum nigrum* e *S. luteum* e observou o desenvolvimento partenogenético haplóide da oosfera de *S. nigrum*. Além da oosfera, as sinérgides também podem desenvolver embriões haplóides resultando, como em *Lilium* (COOPER, 1943), *Bergenia* (LEBÈQUE, 1949) e *Erythraea* (CRÈTE, 1949), em dois tipos de embriões, um diplóide e outro haplóide, podendo prevalecer o diplóide com degeneração do haplóide. HAGERUP (1944, 1945, 1947) encontrou, em *Orchis maculata*, *Epipactis latifolia*, *Platanthera chlorantha* e *Listera ovata*, anormalidades relacionadas com óvulos com mais de um tubo polínico, outros sem nenhum, ou o tubo polínico penetrando tarde demais para efetuar a fertilização. Sob tais condições origina-se embrião haplóide apenas por estímulo da polinização (partenogênese facultativa).

O desenvolvimento de embrião, a partir do gameta masculino (androgênese haplóide), tem sido evidenciado geneticamen



te em vários casos. KOSTOFF (1929), em cruzamentos de *Nicotiana tabacum* e *N. langsdorffii*, obteve uma única planta híbrida que chegou à maturidade com características e número cromossômico da planta masculina, sugerindo sua origem a partir do gameta masculino de *N. langsdorffii*. No mesmo ano, CLAUSEN & LEMERTZ (1929) demonstraram caso análogo em *N. digluta* X *N. tabacum*, também com descendentes com as características citológicas e morfológicas da planta masculina.

Nos dois casos acima, os núcleos gaméticos masculinos iniciaram o desenvolvimento do embrião ainda dentro do tubo polínico, devido à não abertura do mesmo. Normalmente, embriões haplóides podem resultar das seguintes condições; (1) ausência de tubo polínico no óvulo; (2) incapacidade do tubo polínico para liberar os núcleos gaméticos; (3) degeneração precoce dos núcleos gaméticos; e (4) discordância no tempo de maturação da oosfera e da entrada do gameta masculino.

Nas várias formas de apomixia a oosfera não fertilizada se desenvolve assexuadamente por partenogênese. Se outra célula do saco embrionário, que não a oosfera, resultar pelo mesmo processo em um embrião, denomina-se apogametia (RENNER, 1916). Portanto, os principais componentes da apomixia gametofítica, dos tipos diplosporia e aposporia, são a não redução e a partenogênese, permitindo a manutenção da alternância de gerações, mas sem a alternância da fase nuclear, pois o gametófito e o esporófito estão no mesmo nível de ploidia.

apresentam baixa fertilidade do pólen e nestes casos conseguem produzir sementes apenas quando polinizadas por formas não apomíticas vizinhas (NYGREN, 1950; SMITH, 1963).

O nível de ploidia do endosperma pode variar em consequência da fusão ou não dos núcleos polares para formar o nú

I.3 - Formação do endosperma e do embrião nas espécies apomíticas

A formação do endosperma nas espécies apomíticas pode ocorrer de duas maneiras: Em uma delas, o núcleo central requer fertilização para formar o endosperma e somente a oosfera é capaz de desenvolvimento partenogenético. Este tipo de formação do endosperma é designado pseudogamia (apomixia pseudogâmica). Na outra, tanto a oosfera como os núcleos polares são independentes da fertilização e ambos têm formação partenogênica autônoma (apomixia autônoma).

O desenvolvimento pseudogâmico do endosperma foi confirmado pela determinação do número cromossômico nas metáfases do endosperma (HAKANSSON, 1943; RUTISHAUSER, 1954), bem como por observação direta da fertilização (COE, 1953; MOSKOVA & YAKOVLER, 1974; CHAO, 1980). A pseudogamia ocorre na maioria das *Rosaceae* e *Gramineae* apomíticas (NYGREN, 1946; NOGLER, 1984) e esporadicamente em outras famílias com apomixia.

Em geral, espécies apomíticas do mesmo gênero mostram o mesmo tipo de desenvolvimento do endosperma, autônomo ou pseudogâmico. Nas espécies pseudogâmicas a produção de sementes depende da fertilidade do seu pólen e, portanto, tais espécies apresentam tipicamente poucas irregularidades da microporogênese. Porém, excepcionalmente, as plantas pseudogâmicas apresentam baixa fertilidade do pólen e nestes casos conseguem produzir sementes apenas quando polinizadas por formas não apomíticas vizinhas (NYGREN, 1950; SMITH, 1963).

O nível de ploidia do endosperma pode variar em consequência da fusão ou não dos núcleos polares para formar o nú

cleo central e do número de núcleos masculinos que atuam na fecundação (RUTISHAUSER, 1954; ISMAILOW, 1967; NOGLER, 1972).

A incompatibilidade das sementes, demonstrada inicialmente por LAIBACH (1929), resultou na idéia de que a semente para germinar requer um desenvolvimento harmônico do embrião, do endosperma e do tecido materno. Foram estabelecidas algumas hipóteses quanto às relações quantitativas dos genomas daqueles tecidos.

Conforme a primeira, estabelecida por MÜNTZING (1933), a relação entre os genomas do embrião, do endosperma e do tecido materno deve ser respectivamente 2:3:2 para que o rudimento seminal se estabeleça normalmente. Qualquer alteração nessa proporção pode resultar em falha no desenvolvimento da semente. HAKANSSON & ELLERSTROM (1950) e HAKANSSON (1956) realizaram análise do desenvolvimento seminal em cruzamentos nos gêneros *Secale*, *Hordeum*, *Lamium*, *Galeopsis* e *Brassica*. Observaram que os cruzamentos 4x X 4x são normais quando comparados com o controle 2x X 2x, ao contrário dos cruzamentos 4x X 2x com desenvolvimento lento do endosperma e de 2x X 4x com perturbações mitóticas e diferenciação celular do endosperma retardada ou ausente. As proporções genômicas nos cruzamentos 2x X 4x são de 3:4:2 ao invés de 2:3:2 e nos cruzamentos 4x X 2x são de 3:5:4.

Para WATKINS (1932) é decisiva apenas a relação genômica entre endosperma e embrião, baseado nos seus resultados obtidos com espécies de *Triticum*, e nos de GAIRDNER & DARLINGTON (1931) em cruzamentos dos tipos 2x X 4x e 4x X 2x com *Campanula persifolia*. O cruzamento do tipo 2x X 4x resultou em maior descendência tetraplóide frente à quantidade de triplóides esperada, o que levou a conclusão de que a relação

genômica entre endosperma e embrião, favorável à germinação, é de 3:2.

Essas hipóteses foram posteriormente ampliadas por HOWARD (1939, 1942, 1947) em cruzamentos realizados com espécies nos gêneros *Brassica* e *Nasturtium*. O autor defende a relação genômica 4:3 ao invés de 3:2 nos cruzamentos do tipo $2x \times 4x$. Segundo HOWARD, a influência da poliploidia da planta pai ocasiona um efeito quantitativo na fisiologia do desenvolvimento da semente. SKIEBE (1973) declara que o endosperma $3x$ ou múltiplo desse número desenvolve-se bem.

De acordo com NOGLER (1984) as plantas apomíticas pseudogâmicas têm adaptações que mantêm a proporção 3:2, sendo a mais radical aquela encontrada entre as gramíneas apomíticas. Neste caso, o saco embrionário maduro é tetranucleado com apenas um único núcleo polar que, após fertilização por um núcleo gamético masculino reduzido, dá origem a um endosperma triplóide (SAVIDAN, 1975).

Outras modificações na formação do endosperma foram observadas em espécies apomíticas. Na espécie *Ranunculus auricomus* (NOGLER, 1972; 1975) pode ocorrer variação no número cromossômico do endosperma das seguintes formas: por fecundação dos dois núcleos polares não reduzidos, cada um por um gameta masculino reduzido; por fecundação do núcleo central por um único gameta masculino reduzido (HAIR, 1956; CHAO, 1974); e por fecundação de um dos dois núcleos polares não reduzidos por um único gameta masculino reduzido.

A formação do embrião em algumas espécies apomíticas pseudogâmicas ocorre, a exemplo das plantas sexuais, depois de iniciado o desenvolvimento do endosperma. Alguns dos exemplos da literatura incluem *Hypericum perforatum* (NOACK, 1939),

Ranunculus auricomus (RUTISHAUSER, 1954), *R. cassubicus* (IZMAILOU, 1967) e *Panicoideae* apospóricos, como *Panicum maximum* (WARNIKE, 1954), *Pennisetum ciliare* (SNYDER *et alii*, 1955) e *P. dubium* (GILDENHUYS & BRIX, 1959). Porém, outras espécies apomíticas pseudogâmicas mostram desenvolvimento do embrião antes da ântese (embrionia precoce) e o endosperma só se desenvolve depois da fertilização do núcleo central. Exemplos deste tipo são *Poa* (TINNEY, 1940; SKALINSKA, 1959), *Parthenium* (ESAU, 1946) e *Tripsacum dactyloides* (FARQUHARSON, 1955), entre outros. Em certos gêneros, existem as duas condições, dependendo da espécie, como por exemplo em *Potentilla* (RUTISHAUSER, 1948; SMITH, 1963) e *Paspalum* (SNYDER, 1957; REUSCH, 1961).

Entre os apomíticos autônomos prevalece a embrionia precoce, como em *Hieracium* (SKALINSKA, 1973) e *Taraxacum* (MALECKA, 1971), podendo ocorrer também a iniciação do endosperma antes da ântese. A importância da embrionia precoce é a de prevenir a reprodução sexuada, tanto de oosferas não reduzidas como de reduzidas (RUTISHAUSER, 1948; ASKER, 1977).

I.4 - A meiose nas espécies apomíticas

A irregularidade no processo meiótico é uma das características mais evidentes das plantas apomíticas e diz respeito tanto à megasporogênese como à microsporogênese. Nesta, ocorre desde a normalidade até a completa esterilidade, existindo uma correlação entre o tipo de apomixia, o tipo de desenvolvimento do endosperma e o grau de distúrbio meiótico. Tais distúrbios são encontrados apenas ocasionalmente nas plan

tas com reprodução assexuada (senso estrito) e na embrionia adventícia, não podendo ser considerados características desses fenômenos (STEBBINS, 1950).

A situação encontrada na microsporogênese das espécies apospóricas e diplospóricas depende em grande parte do tipo de desenvolvimento do endosperma, se autônomo ou pseudogâmico. As espécies pseudogâmicas, tanto apospóricas como diplospóricas, requerem a produção de pólen viável para a fecundação do núcleo central e a subsequente formação do endosperma e tendem a exibir um maior grau de normalidade meiótica do que as plantas com endosperma autônomo. Apesar de ser geralmente bom, o pareamento cromossômico nas espécies pseudogâmicas é raramente perfeito devido a presença de univalentes e multivalentes. A ocorrência dessas associações resulta na redução da fertilidade do pólen, porém a produção de pólen viável é geralmente suficiente para permitir a produção de sementes (GUSTAFSSON, 1947). Existem poucos casos registrados de plantas pseudogâmicas que manifestam plena esterilidade masculina, como ocorre, por exemplo, em espécies triplóides do gênero *Rubus* da Europa (GUSTAFSSON, 1947), em *Poa arctica* (NYGREN, 1950) e em *Potentilla tabernaemontani* (SMITH, 1963). Em tais casos, a formação de sementes depende de biótipos férteis dos arredores para a fertilização do núcleo central.

As espécies apospóricas autônomas apresentam a meiose da microsporogênese bastante semelhante àquela das plantas pseudogâmicas apospóricas ou diplospóricas. Isto é, as irregularidades observadas resultam predominantemente da formação de univalentes e multivalentes (GUSTAFSSON, 1947; STEBBINS, 1950). Uma vez que o pólen não exerce papel reprodutivo, a redução da fertilidade masculina, seja qual for o grau,

não prejudica a formação de sementes. Certas espécies apospóricas de *Cortaderia* são conhecidas apenas por plantas femininas (CONNOR, 1979), o que indica a não dependência do sexo masculino.

O maior grau de distúrbios meióticos durante a microsporogênese ocorrem nas espécies diplospóricas autônomas. As anormalidades mais frequentes são: a ausência de pareamento cromossômico, a falta de contração cromossômica e o retardamento ou precocidade das divisões meióticas (GUSTAFSSON, 1947; STEBBINS, 1950). É significativo que o comportamento meiótico da microsporogênese e da megasporogênese podem diferir. Em *Antennaria falax*, por exemplo, a meiose da microsporogênese exibe um alto grau de formação de bivalentes, enquanto a megasporogênese revela uma falta quase total de pareamento (STEBBINS, 1932). NYGREN (1946) demonstrou que em *Calamagrostis lapponica* ocorrem divisões meióticas nas anteras, enquanto que nos óvulos as divisões são mitóticas. Em *C. chalybaea* a situação é a reversa. Estes casos, entre outros, demonstram que nas plantas diplospóricas autônomas a falta ou redução de pareamento cromossômico não deve ser interpretada como necessariamente indicando a falta de homologia cromossômica.

Os mecanismos que controlam a produção de saco embrionário, sexuada ou assexuada, são pouco entendidos. Acredita-se porém que o grau de sexualidade do gametófito apomítico seja a expressão fenotípica de um sistema gênico complexo (HESLOP-HARRISON, 1963; KNOX, 1967; SARAN & DE WET, 1970). A expressão quantitativa do balanço entre a sexualidade e apomixia pode ser avaliada pela porcentagem de óvulos contendo sacos embrionários não reduzidos ou pela porcentagem de descendentes maternos apomíticos.

I.5 - O controle genético do fenômeno apomítico

Alguns modelos de regulação genética da apomixia gametofítica têm sido propostos.

O primeiro foi o de POWERS (1945) que trabalhou com *Parthenium argentatum*, uma espécie diplospórica pseudogâmica. O autor sugeriu a homozigocidade para certos genes recessivos, como pré-requisito para a reprodução apomítica, controlada por 3 genes: um deles produz oosferas não reduzidas (Aa), outro impede a fertilização (Bb) e um terceiro controla o desenvolvimento partenogenético da oosfera (Cc). A apomixia se originaria a nível diplóide e a planta teria o genótipo aabbcc.

BURTON & FORBES (1960) sugeriram que o controle da apomixia também em *Paspalum notatum* se faz por poucos genes recessivos.

LILJEFORS (1955) determinou na espécie tetraplóide *Sorbus aria* o genoma A para apomixia e o genoma B do diplóide *S. aucuparia*, que transporta genes correspondentes à sexualidade. Neste sistema, apomixia e sexualidade dependem do balanço entre os genes que controlam as duas características. Os cruzamentos entre as duas espécies resultaram em triplóides e tetraplóides com os seguintes genótipos e fenótipos: apomítico obrigatório (AAAA, AAAB, AAB), apomítico ou sexuado (AABB, ABB) e totalmente sexuado (BB).

Em *Pennisetum ciliare* a herança da apomixia foi estudada por TALIAFERRO & BASHAW (1966). Cruzamentos entre apomíticos obrigatórios e sexuais resultaram na proporção de 5 apomíticos para 3 sexuais. O sistema de controle proposto seria o do gene que condiciona a sexualidade (B) ser epistático sobre o que controla a apomixia (A). O genótipo da planta sexua

da seria AaBb e o da apomítica Aabb.

HANNA *et alii* (1973) obtiveram, em *Panicum maximum* sexuada autopolinizada, progênie sexuada e apomítica na proporção de 11:5. O controle sugerido é o de 2 locus, sendo os genótipos aabb, Aabb e aaBb apomíticos apospóricos. O genótipo AaBb produz descendentes apomíticos e sexuais, enquanto que os genótipos AABB, AABb, AAbb, AaBB e aaBB produzem somente progênie sexuada.

Os trabalhos de SAVIDAN (1978) em *Panicum maximum* e de NOGLER (1978) em *Ranunculus auricomus* indicaram que a presença de aposporia nessas espécies está sob controle genético simples, ou seja, de um único gene dominante.

NOGLER (1971, 1975, 1984) realizou estudos com o gênero *Ranunculus* analisando o cruzamento do sexuada diplóide *R. cassubiciifolius* com o apomítico tetraplóide *R. megacarpus* e concluiu que um par de alelos A^+A^- causa presença de saco embrionário apospórico e os sexuais são sempre diplóides A^+A^+ . Este esquema é significativo pois explica a freqüente obtenção de planta sexuada a partir de cruzamentos de plantas apomíticas pela recombinação de fatores A^+ . O A^-A^- não foi encontrado, pois A^- não é transmitido por pólen haplóide.

SAVIDAN (1975, 1978, 1980, 1982) determinou em *Panicum maximum* aposporia heterozigota. Em *Poa* (ALMGARD, 1966) e no complexo *Bothriochloa-Dicanthium* (D'CRUZ & REDDY, 1971), assim como em cruzamentos entre o diplóide *Beta vulgaris* e o tetraplóide apospórico *Beta lamatogona* (CLEU *et alii*, 1976) revelou-se do tipo de herança apospórica dominante.

O controle genético da diplosporia não está bem esclarecido. NOGLER (1984) sugere que o controle genético da aposporia e da diplosporia pode ser o mesmo, uma vez que a di-

ferença principal entre os dois fenômenos é uma questão do tempo de indução do saco embrionário. Em diplosporia o tempo é antecipado, ocorrendo antes do início da meiose. Plantas como *Antennaria*, *Parthenium*, *Rubus* e *Potentilla*, podem exibir tanto a diplosporia como a aposporia, indicando um controle genético comum.

A influência de fatores ambientais na ocorrência de aposporia tem sido demonstrada. SARAN & DE WET (1970, 1976) estudando *Bothriochloa intermedia*, demonstraram que essa espécie se reproduz sexualmente durante o verão, mas comporta-se como apomítica facultativa durante o inverno. Em populações naturais de *Dicanthium aristatum* foram encontradas transições entre a condição apomítica e a sexuada em diferentes latitudes e épocas do ano, na Austrália (KNOX, 1963; HESLOP-HARRISON, 1963).

I.6 - Hibridização, Alogamia, Hábito perene e Poliploidia

Devido a comprovada natureza híbrida de muitas das plantas apomíticas, EARNST (1918) sugeriu que o próprio fenômeno da hibridização seria a causa da apomixia. Porém, logo ficou evidente que, embora plantas apomíticas sejam frequentemente híbridas, os híbridos inter e intraespecíficos raramente são apomíticos.

Atualmente, entende-se que as plantas apomíticas geralmente se originam de ancestrais alogâmicas e perenes. A alogamia promove hibridização intra e interespecífica que por sua vez possibilita juntar alelos para a não redução da oosfera e da partenogênese, os elementos essenciais da apomixia (ASKER, 1980).

1.7 - Sig Existe uma associação entre a alogamia e o hábito perene e portanto, a associação de alogamia com apomixia implicaria necessariamente na associação do hábito perene com a apomixia. Porém, também é possível que o hábito perene confira alguma vantagem seletiva, pois os híbridos interespecíficos e os poliplóides ímpares são freqüentemente estéreis e a longevidade conferida pelo hábito perene possibilita o acúmulo de mutações favorecendo a apomixia.

Também, existe uma associação entre apomixia e poliploidia. Nos complexos apomíticos, as espécies diplóides são geralmente sexuadas e a apomixia aumenta dentro do complexo, à medida que o nível de ploidia aumenta. Os poliplóides ímpares tais como 3x, 5x, 7x são altamente estéreis e a apomixia em qualquer grau, seria adaptativa (NOGLER, 1984).

No complexo *Bothriochloa-Dicanthium* foi descrito um ciclo diplóide-tetraplóide-haplóide. Nas populações deste complexo ocorrem plantas tetraplóides sexuadas, plantas tetraplóides apomíticas e plantas diplóides sexuadas, predominando as plantas tetraplóides apomíticas. As plantas diplóides sexuadas são originadas das tetraplóides apomíticas por partenogênese haplóide (dihaplóide) e as tetraplóides sexuadas, das diplóides sexuadas pela fusão de gametas não reduzidos. Ao nível tetraplóide, ocorre troca de genes entre as plantas sexuadas e apomíticas, como também existe a incorporação de genes das plantas diplóides na formação de novos indivíduos tetraplóides sexuados (DE WET & HARLAN, 1970).

1.7 - Significado evolutivo da apomixia

Uma das primeiras teorias formuladas quanto ao significado evolutivo da apomixia foi a do "escape da esterilidade" (DARLINGTON, 1939). Segundo esta teoria, a principal vantagem adaptativa da apomixia é a de restaurar a fertilidade em plantas que seriam sexualmente estéreis em consequência da poliploidia impar ou da hibridização. Porém, Darlington também argumentou que a apomixia restringe a recombinação e, portanto, limita o potencial evolutivo do grupo apomítico. Esta teoria tem sido aceita por vários pesquisadores da área, incluindo STEBBINS (1950) e DE WET & STALKER (1974).

CLAUSEN (1954) foi quem primeiro sugeriu que a apomixia, especialmente a facultativa, não conduz necessariamente à perda de variabilidade e potencial evolutivo. Argumentou que a combinação da sexualidade e apomixia é altamente adaptativa, pois a sexualidade permite a formação de genótipos novos e a apomixia, a reprodução fiel dos melhores adaptados desses genótipos. A posição de CLAUSEN é atualmente a mais aceita, com seguidores como HESLOP-HARRISON (1961), GRANT (1971) e MARSHAL & BROWN (1981), entre outros.

Mesmo nas plantas apomíticas obrigatórias existem fontes assexuadas de variabilidade, como mutações somáticas, auto-segregação e reprodução subsexuada. Auto-segregação (GUSTAFSSON, 1935) ocorre quando no megasporócito um núcleo de restituição deixa de incluir alguns dos cromossomos, resultando na formação de embrião aneuplóide. Reprodução subsexuada (DARLINGTON, 1958) ocorre quando na divisão do núcleo do megasporócito existe pareamento e crossing-over entre alguns dos cromossomos, seguido da segregação na primeira ou segunda divi

são. Uma vez que uma das divisões é suprimida, não ocorre redução.

I.8 - Apomixia e melhoramento vegetal

Resumidamente, algumas vantagens da apomixia são:

- 1 - a apomixia confere capacidade reprodutiva às plantas que, de outra maneira, seriam estéreis, como no caso dos híbridos interespecíficos e autopoliplóides ímpares;
- 2 - a apomixia fixa a heterose consequente da hibridização e biótipos especialmente bem adaptados são perpetuados;
- 3 - as plantas apomíticas de origem híbrida e alopoliplóide geralmente somam as tolerâncias ecológicas das espécies parentais, permitindo a ocupação de uma maior variedade de habitats;
- 4 - a independência de polinizadores pode ser vantajosa no caso dos apomíticos autônomos, especialmente em climas severos e com poucos polinizadores;
- 5 - a propagação através de sementes agamospérmicas tem vantagem sobre a propagação vegetativa, permitindo adaptações como dormência e capacidade de dispersão.

O estudo da apomixia poderá contribuir, sob o ponto de vista prático, em programas de melhoramento vegetal em que o objetivo principal é o de fixar a heterose, especialmente de plantas sexuais que não têm boa capacidade de propagação vegetativa. Incluídas nesta categoria estão quase todas as plantas anuais, especialmente os cereais (MATZK, 1982). Melhoramento está sendo tentado em populações sexuais nas quais podem ser encontrados elementos da apomixia, como distúrbio da



meiose na megasporogênese, com tendência a formar saco embriológico não reduzido, ou com tendência a desenvolvimento partenogênético. Linhagens com tais características são intercruzadas para que seja aumentada a frequência dos elementos que constituem a apomixia gametofítica e para que ocorram associados.

Cruzamentos de espécies apomíticas facultativas com espécies sexuadas relacionadas e de interesse econômico, tem sido também um método comumente usado em milho, trigo, sorgo, maçã, morango e beterraba, entre outros (NOGLER, 1984). A reprodução apomítica permitiria a fixação de qualquer combinação gênica desejada, assim como manteria novas variedades heterozigotas com propriedades agronômicas valiosas como, por exemplo, genes para resistência à doenças.

I.9 - Objetivos

Este estudo teve por objetivo investigar o modo de reprodução da espécie *Eupatorium squalidum* DC (Compositae) e compreendendo as seguintes etapas:

- 1 - Desenvolvimento do gametófito feminino.
- 2 - Estudo da microsporogênese.
- 3 - Estudo do cariótipo.
- 4 - Estudo da produção e germinabilidade das sementes.
- 5 - Observações de campo.

II - MATERIAL E MÉTODOS

Eupatorium squalidum, chamado vulgarmente de cambarã-roxo, é uma planta anual, subarbastiva, erecta e irregularmente ramificada, medindo de 70 a 130 cm de altura. As folhas cosidas são usadas como emoliente e contra febres intermitentes e infecciosas (LORENZI, 1982).

Plantas de populações naturais utilizadas neste trabalho foram localizadas e coletadas num raio de 15 km do município de São José do Rio Preto (SP) durante os anos de 1984-1985, situadas em geral à beira de estradas ou entre vegetação de campo e com floração durante os meses de abril e maio. A identificação do material foi verificada pela Dra. Graziela Maciel Barroso e excicatas foram depositadas no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RJ) e do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo (SP).

Para o estudo da megasporogênese e da megagametofitogênese foram usados botões florais fixados em F.A.A. e CRAF. Foram dois os processos utilizados nesse estudo:

1) cortes permanentes, previamente incluídos em para fina e corados com fast green e safranina (JOHANSEN, 1940); e

2) a diafanização (HERR, 1971 e 1972). Uma vez que o método de diafanização provou dar melhores resultados com menor investimento de tempo e material, este foi o método mais utilizado no estudo da megasporogênese. O material fixado em F.A.A. (JOHANSEN, 1940) foi estocado nessa solução e o fixado em CRAF (LA COUR, 1937) foi lavado várias vezes depois de 24 horas e em seguida transferido para etanol 70%. O material fixado foi conservado em geladeira, em recipiente tampado. Para o método de diafanização, óvulos contidos no ovário foram retirados sob lupa com auxílio de estiletes e colocados em um vidro de relógio contendo solução clarificadora durante 4 a 8 dias. Após a diafanização, os óvulos foram montados em meio de Hoyer (ALEXOPOULOS & BENEKE, 1952) e levados ao microscópio para exame e selecionados para fotografia.

Com o objetivo de se verificar o conteúdo de óvulos de flores foi realizado um estudo nas fases de pré-ântese, ântese e pós-ântese. Como fase de pré-ântese foram considerados os botões florais com os estigmas ainda contidos dentro do botão, em geral até 24 horas antes da ântese, a fase na qual os estigmas estão expostos e evidentemente receptivos e a de pós-ântese, a fase na qual os estigmas expostos evidenciam sinais de ressecamento e escurecimento. Nesta fase, supõe-se que a receptividade esteja terminada. Foram estudados ainda cerca de 300 óvulos em fase mais jovem que a de pré-ântese com a finalidade de se verificar a seqüência de desenvolvimento da megasporogênese e da megagametofitogênese a partir do megasporócito.

Para o estudo da microsporogênese botões florais em várias fases de desenvolvimento foram fixados em solução de etanol absoluto e ácido acético (3:1) por 24 horas e em seguida transferidos para etanol 70% e estocados em geladeira. As anteras retiradas das flores foram tratadas com a técnica de esmagamento. Esta técnica envolve a retirada das anteras sob lupa em uma gota de álcool que em seguida é absorvida por papel de filtro. Sobre as anteras é colocada uma gota de carmim acético na qual é realizada a maceração das mesmas com auxílio de uma espátula e o excesso do material mais grosso e visível a olho nú, é retirado. A seguir, o material é coberto com lâminula e aquecido sobre chama de lamparina a álcool. Se fases desejadas são observadas ao microscópio é aplicada pressão à

lâmina, com a lamínula voltada para baixo, sobre papel de filtro, com o dedo polegar na direção do material, evitando-se qualquer movimento lateral da lâmina. A lamínula é em seguida levantada com auxílio de uma lâmina gilete e sobre o material é colocada uma gota de meio de Hoyer, sobre o qual é recolocada a lamínula e novamente é reaplicada pressão, para que os cromossomos sejam suficientemente espalhados.

Para o estudo do cariótipo, inicialmente foram postas sementes para germinar sobre papel de filtro, em placas de Petri. Extremidades de radículas, de cerca de 20 mm de comprimento foram tratadas em placas de Petri contendo oxiquinoleína a 0,002 M como pré-tratamento a uma temperatura de 10° a 18°C obtida com o uso de gelo ao redor da placa, durante 5 horas sendo o material arejado durante esse período com o auxílio de uma bomba injetora. As pontas de raízes foram em seguida fixadas com etanol absoluto e ácido acético 3:1 por 15 a 30 minutos e transferidas para álcool 70%, no qual foram estocadas.

Para a análise do cariótipo, as pontas de raízes sofreram inicialmente um processo de hidrólise em HCl 1N a 60°C por 4 a 6 minutos, com a finalidade de permitir uma melhor separação das células. Em seguida, foram lavadas e transferidas para um vidro de relógio pequeno, contendo carmim acético e aquecidas sobre lamparina a álcool e deixadas por 20 a 30 minutos naquele corante. Após aquele período, 5 raízes foram transferidas para uma lâmina contendo uma gota de meio de Hoyer e o meristema apical foi raspado com auxílio de um estilete, fazendo uma suspensão de células no meio. O excesso de tecido visto a olho nú foi retirado e a lamínula foi colocada sobre o material para observação ao microscópio. Encontrando-se fases desejadas é aplicada pressão sobre a lamínula, protegida

com papel de filtro. Para que os cromossomos fossem suficientemente espalhados, a pressão neste caso foi exercida com auxílio de um alicate.

A análise do cariótipo foi realizada utilizando fotografias de 6 células ampliadas para um aumento total de 3.750 vezes. Lâmina milimetrada foi usada para a medida do braço longo (L) e do braço curto (C) dos cromossomos, bem como do comprimento total (L+C). As medidas foram convertidas em valores reais na base da ampliação usada, ou seja, 3,75 mm equivalente a um micron.

A caracterização do genoma básico foi determinada a partir das 6 células analisadas, utilizando-se em cada uma delas o comprimento cromossômico e a posição do centrômero. Grupos de 3 cromossomos equivalentes foram reunidos a partir de cada uma das 6 células analisadas, em um total de 18 cromossomos, sendo considerados para a caracterização de cada um dos 10 cromossomos do genoma. Foi elaborado um idiograma baseado nessas medidas. Obteve-se o comprimento do genoma através da divisão por três do comprimento médio do complemento cromossômico das seis células analisadas.

Para o estudo da germinabilidade e da produção de sementes utilizou-se plantas de populações naturais que, em fase de botão, receberam 3 tratamentos diferentes: 1) alguns capítulos intactos foram cobertos com sacos de papel amarrados na base, de modo a impossibilitar a fertilização, embora não excluindo a possibilidade de autofecundação; 2) outros capítulos foram emasculados com auxílio de uma tesoura para impedir a fertilização e ensacados em seguida; 3) outros capítulos foram simplesmente marcados para funcionar como controle.

O filme usado para fotografias foi o KODAK PANATOMIC-X



32ASA, ou ocasionalmente o AGFA-GEVAERT COPEX PAN A.H.U. TRI 13. O papel fotográfico empregado nas cópias foi o KODAK F₄. Os equipamentos ópticos utilizados foram: um estereomicroscópio Zeiss SRBr e um fotomicroscópio Zeiss Standard equipado com contraste de fase tendo acoplada uma máquina fotográfica.

As observações realizadas sobre a embriologia da megasporogênese e da megagametofitogênese em *Eupatorium aqualidum*, tiveram como objetivo verificar o tipo de saco embrionário formado, bem como o de desenvolvimento do embrião e do endosperma, considerando-se as fases iniciais de desenvolvimento de botão floral e dos estágios de pré-ântese, ântese e pós-ântese.

A espécie possui óvulos típicos da família Compositas (DAVIS, 1966), ou seja, anátropos com um sô tegumento, tenuenucelado e com uma única célula arquesporai inicial, que funciona diretamente como megasporócito (Figura 1). A análise de cerca de 300 óvulos em fases iniciais de desenvolvimento, retirados de várias plantas em fase de megasporogênese revelou a ausência de tetrades de megásporos, o que indica a ausência de meiose reduitiva. A formação do saco embrionário se faz a partir do megasporócito (Figura 2) que funciona diretamente como megásporo. O núcleo deste, ao se dividir, dá origem a um saco embrionário binucleado (Figura 3). Em seguida, o saco embrionário se alonga, permitindo que os dois núcleos se afastem, um do outro, tomando posições nas extremidades opostas da célula (Figura 4). Cada um dos núcleos sofre uma segunda divisão formando o saco embrionário tetra-nucleado (Figura 5). A seguir, cada um dos quatro núcleos, em uma terceira divisão, dá origem a um saco embrionário do tipo Polygonum, com 8 núcleos, composto de duas sinérgides, uma oosfera, dois núcleos polares

III - RESULTADOS

III.1 - Desenvolvimento do gametófito feminino

As observações realizadas sobre a embriologia da megasporogênese e da megagametofitogênese em *Eupatorium squalidum*, tiveram como objetivo verificar o tipo de saco embrionário formado, bem como o do desenvolvimento do embrião e do endosperma, considerando-se as fases iniciais de desenvolvimento de botão floral e dos estágios de pré-ântese, ântese e pós-ântese.

A espécie possui óvulos típicos da família Compositae (DAVIS, 1966), ou seja, anátropos com um só tegumento, tenuenucelado e com uma única célula arquesporial inicial, que funciona diretamente como megasporócito (Figura 1). A análise de cerca de 300 óvulos em fases iniciais de desenvolvimento, retirados de várias plantas em fase de megasporogênese revelou a ausência de tétrades de megásporos, o que indica a ausência de meiose redutiva. A formação do saco embrionário se faz a partir do megasporócito (Figura 2) que funciona diretamente como megásporo. O núcleo deste, ao se dividir, dá origem a um saco embrionário binucleado (Figura 3). Em seguida, o saco embrionário se alonga, permitindo que os dois núcleos se afastem, um do outro, tomando posições nas extremidades opostas da célula (Figura 4). Cada um dos núcleos sofre uma segunda divisão formando o saco embrionário tetra-nucleado (Figura 5). A seguir, cada um dos quatro núcleos, em uma terceira divisão, dá origem a um saco embrionário do tipo Polygonum, com 8 núcleos, composto de duas sinérgides, uma oosfera, dois núcleos polares

e três antípodas (Figura 6). As antípodas formam três células (Figura 7) e as sinérgides degeneram rapidamente, resultando um saco com apenas a oosfera e os dois núcleos polares (Figura 8). Logo a seguir, os núcleos polares se fundem formando o núcleo central (Figura 9). Observou-se que a oosfera inicia a formação do embrião antes do núcleo central iniciar divisão (Figuras 10 e 11) para formar o endosperma (Figura 12).

As únicas anomalias observadas durante o desenvolvimento do saco embrionário ocorreram em associação com as fases binucleadas e tetranucleadas nas quais foram encontrados dois casos de falta de sincronia das divisões nucleares. Em um dos casos, o núcleo chalazal já se encontrava dividido e o núcleo micropilar não, resultando um saco embrionário trinucleado (Figura 13). No segundo caso, o saco embrionário aparentemente alcançou a fase tetra-nucleada normalmente, porém, um dos núcleos da região micropilar sofreu duas divisões adicionais, resultando um saco embrionário com dois núcleos na região chalazal e quatro na região micropilar sendo um núcleo maior e três menores (Figura 14). Foram observados sacos embrionários abortados (Figura 15), provavelmente resultantes de tais irregularidades.

Os resultados da análise do conteúdo de óvulos de flores nas fases de pré-ântese, ântese e pós-ântese estão resumidos na Tabela 1.

Uma mesma proporção de óvulos abortados (11,4%) foram encontrados nas fases de pré-ântese e ântese, diminuindo para 4,5% na fase de pós-ântese, provavelmente em consequência da degeneração de uma parte daqueles óvulos.

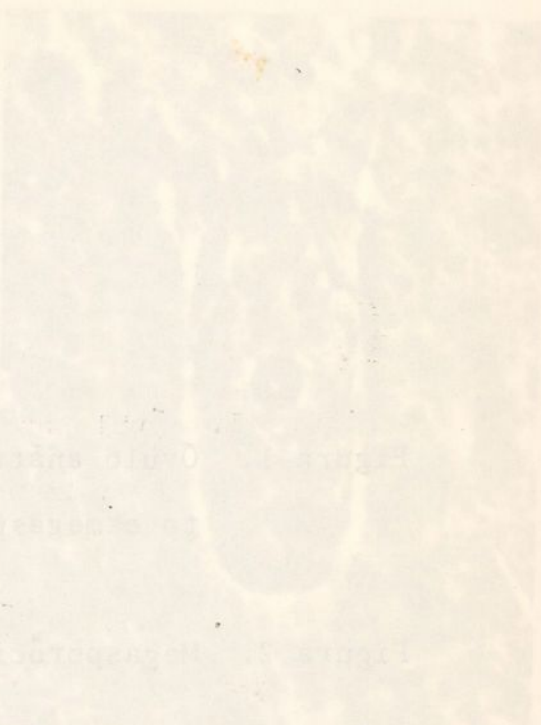
Na análise de 1.377 óvulos nas três fases consideradas, foi observada a presença de oosfera/núcleos polares,

oosfera/núcleo central, embrião/núcleo central, embrião/endosperma, além de sacos embrionários abortados.

Para 587 óvulos examinados na fase de pré-ântese, a oosfera/núcleos polares correspondem com 0,3% e a oosfera/núcleo central, 19,0%. Foi observada uma proporção maior, comparadas às fases seguintes, de embrião/núcleo central, com 68,8% e 0,3% de embrião e andosperma.

Dos 525 óvulos examinados na fase de ântese não aparece a fase de oosfera/núcleos polares, com diminuição de ocorrência de oosfera/núcleo central para 1,9%, bem como aumento das fases subseqüentes para 43,2% de embrião/núcleo central e 43,4% de embrião/endosperma.

A análise de 265 óvulos de flores em pós-ântese revelou ausência das fases iniciais de oosfera/núcleos polares e oosfera/núcleo central e a presença de embrião/núcleo central com 34,3%. Porém, houve um aumento para 61,1% de embrião/endosperma.



Figuras de 1 a 15. Megagametofitogênese e o desenvolvimento do embrião e endosperma em *Eupatorium squalidum*.

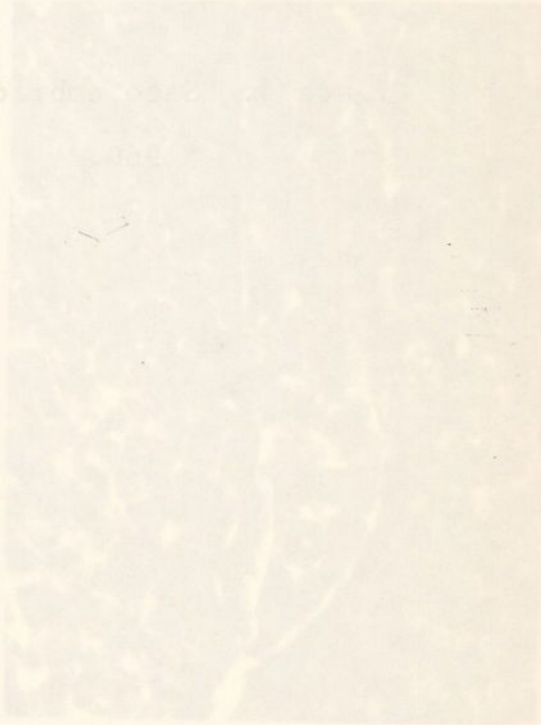


Figura 1. Óvulo anátropo, tenuenucelado, com um único tegumento e megasporócito. X 235.

Figura 2. Megasporócito (megásporo funcional). X 1600.

Figura 3. Saco embrionário binucleado, estágio inicial.
X 960.

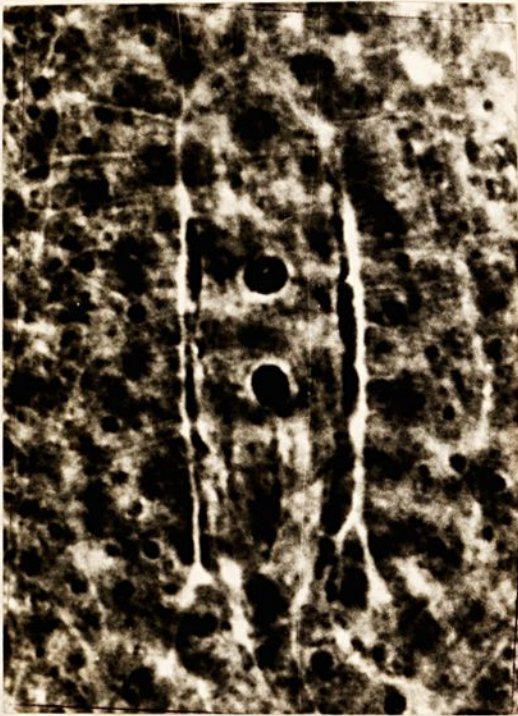
Figura 4. Saco embrionário binucleado, estágio avançado.
X 960.



1



2



3



4

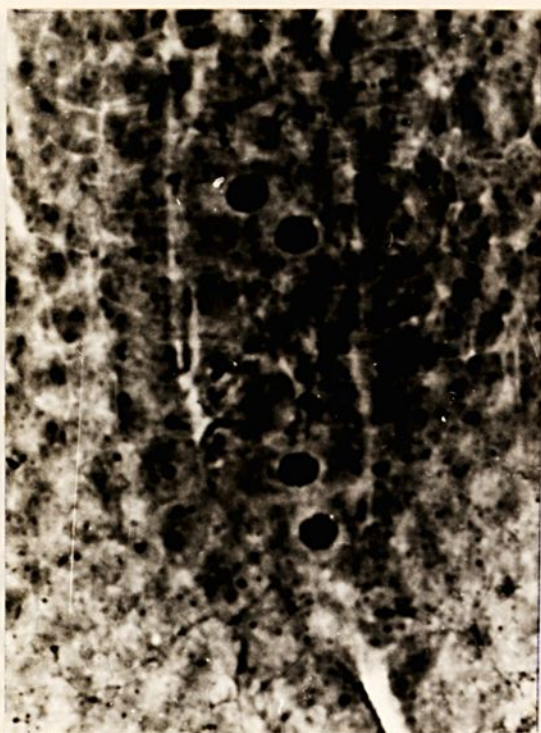
Figura 5. Saco embrionário tetranucleado. X 760.

Figura 6. Saco embrionário com dois núcleos polares, oosfera e duas sinérgides. X 750.

Figura 7. Saco embrionário com três antípodas. X 480.

Figura 8. Saco embrionário binucleado, estágio inicial.

Figura 8. Saco embrionário com os dois núcleos polares acima da oosfera. X 750.



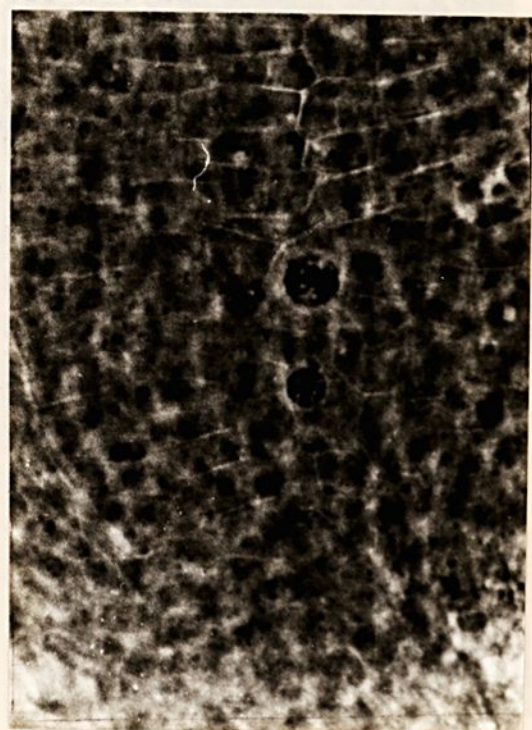
5



6



7



8

Figura 9. Saco embrionário com oosfera (núcleo menor) e núcleo central (núcleo maior). X 500.

Figura 10. Embrião e núcleo central com a parte inferior do saco embrionário removido. X 625.

Figura 11. Saco embrionário com embrião (pequeno núcleo à direita) e núcleo central (núcleo maior à esquerda). X 625.

Figura 12. Saco embrionário com embrião (núcleo menor à esquerda) e endosperma (grupo de núcleos maiores à direita). X 750.



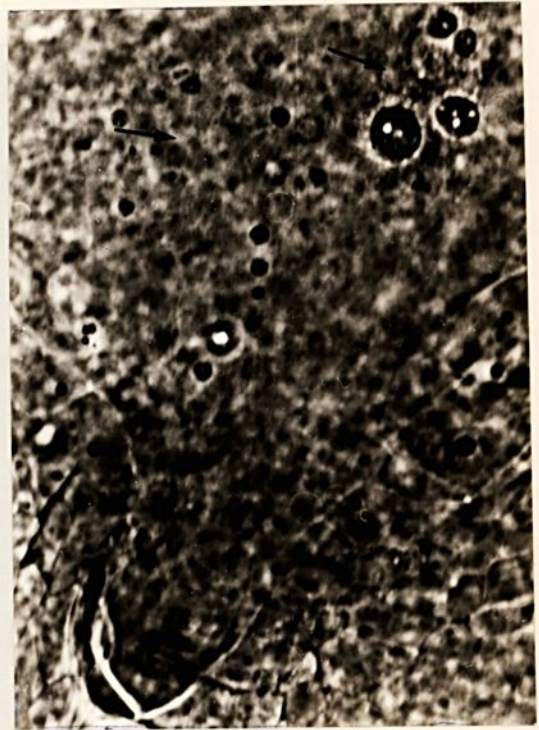
9



10



11

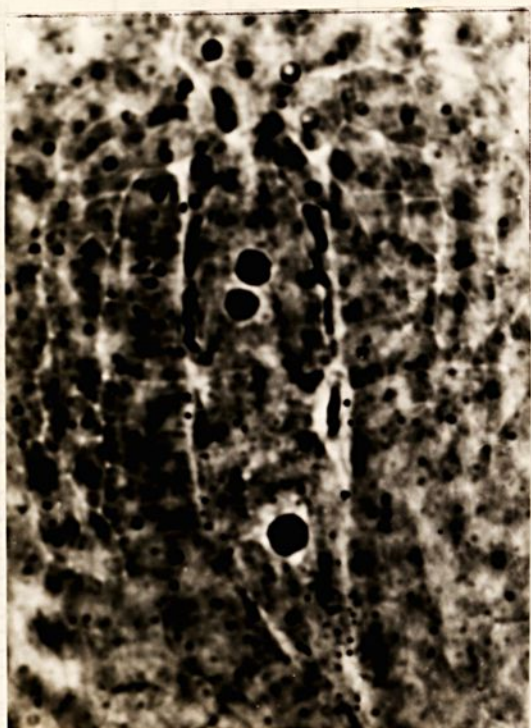


12

Figura 13. Saco embrionário anormal trinucleado. X 750.

Figura 14. Saco embrionário anormal hexanucleado. X 600.

Figura 15. Saco embrionário abortado. X 1000.



13



14



15

Tabela 1: Conteúdo de óvulos de *Eupatorium squalidum* em diferentes estágios de desenvolvimento floral.

Estágio floral	Planta	Óvulos examinados	Saco embrionário abortado		Oosfera e núcleos polares		Oosfera e núcleo central		Embrião e núcleo central		Embrião e endosperma	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Pré ântese	1	123	33	26,8			25	20,3	64	52,0	1	0,8
	2	119	2	1,7	1	0,8	13	10,9	103	86,6		
	3	105	8	7,6			22	20,9	75	71,4		
	4	104	12	11,5	1	1,0	22	21,1	69	66,4		
	5	136	12	8,8			30	22,0	93	68,4	1	0,7
Total	5	587	67	11,4	2	0,3	112	19,0	404	68,8	2	0,3
Ântese	1	123	23	18,7			7	5,7	48	39,0	45	36,6
	2	136	11	8,1					56	41,2	69	50,7
	3	77	5	6,7					37	48,1	35	45,5
	4	34	6	17,7			2	5,9	12	35,3	14	41,2
	5	155	15	9,7			1	0,7	74	47,7	65	41,9
Total	5	525	60	11,4			10	1,9	227	43,2	228	43,4
Pós ântese	1	63	1	1,6					16	25,4	46	73,0
	2	72	2	2,8					24	33,3	46	63,9
	3	44	2	4,6					15	34,1	27	61,4
	4	51	3	5,9					26	51,0	22	43,1
	5	35	4	11,4					10	28,6	21	60,0
Total	5	265	12	26,3					91	34,3	162	61,1
Total geral	15	1377	139	10,1	2	0,1	122	8,9	722	52,4	392	28,5

III.2 - Desenvolvimento da Microsporogênese

Das seis plantas analisadas quanto ao pareamento cromossômico, em diacinese da microsporogênese, foi constatada a existência de univalentes, bivalentes e trivalentes em cada uma delas (Figuras 16 a 20). No entanto, uma variação considerável foi detectada, tanto em uma mesma planta como entre elas, quanto a frequência dessas associações. As análises das associações, bem como do pareamento cromossômico estão resumidas nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. As fases subsequentes de meiose revelaram anormalidades ocasionadas em grande parte pela ocorrência de univalentes e trivalentes. Cromossomos não alinhados na placa metafásica, principalmente univalentes, foram frequentes (Figura 21). Anomalias observadas durante a anáfase I incluem disjunção precoce das cromátides (Figura 22), cromossomos retardatários (Figura 23) e a distribuição desigual dos cromossomos aos pólos (Figuras 24 e 25). Cromossomos retardatários também ocorreram na anáfase II (Figura 26), bem como a formação de tétrades de núcleos de tamanhos notavelmente diferentes (Figura 27) indicando um não balanceamento genético. Outra irregularidade particularmente notável, foi a formação de núcleos de restituição durante a primeira divisão e, conseqüentemente, a ocorrência de meiose não redutiva. A formação dos núcleos de restituição inicia-se na anáfase I com a não separação ou separação incompleta dos cromossomos nos polos (Figura 28), e sua subseqüente incorporação em um único núcleo que mantém o número cromossômico original. A segunda divisão, que é equacional, resulta na formação de dois núcleos não reduzidos (Figura 29) e, subseqüentemente, díades de micrósporos (Figura 30). Observou-se também, na segunda divisão, que



grupos de cromossomos de uma téttrade poderiam ficar tão próximas entre si que dois ou mais acabaram sendo incorporados em um único núcleo de restituição (Figura 31). Uma parte dos cromossomos retardatários freqüentemente ficou excluída dos núcleos (Figura 31).

Em consequência das diversas anomalias acima descritas, além de produzir tétrades de micrósporos, a microsporogênese também resultou na produção de tétrades com micrósporos supernumerários (Figura 32), tríades (Figura 33) e díades, sem (Figura 30) ou com micrósporos supernumerários (Figuras 34 e 35).

Nem sempre foi possível a distinção entre núcleos de restituição formados por falha da primeira ou da segunda divisão. Porém, ficou evidente que núcleos de restituição resultantes de falha na primeira divisão foram os mais freqüentes.

A produção de micrósporos não reduzidos é significativa, pois todos os 30 cromossomos estando presentes, poderiam possivelmente conferir fertilidade. Porém, a não inclusão de alguns cromossomos no núcleo de restituição resultaria na formação de díades com micrósporos deficientes. Embora haja formação de pólen considera-se pouco provável a sua plena viabilidade.

As freqüências das associações cromossômicas em univalentes, bivalentes, trivalentes e de quiasmas por célula estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3. A média mais alta de associações trivalentes por célula, foi observada na planta 5 (54,1%). Nessa planta, bem como na planta 6 foram observados os 30 cromossomos associados em trivalentes. Mesmo assim, células com até 14 univalentes foram também encontradas na planta 5. Assim, na Tabela 3, na qual constam as freqüências de univalentes, bivalentes e trivalentes em diacinese, podemos observar que dos 2.430 cromossomos das 81 células anali-



sadas da planta 5, 406 (16,7%) ocorreram como univalentes, 710 (29,2%) como bivalentes, e 1.314 (54,0%) como trivalentes. A planta número 3 mostrou a mais alta frequência de univalentes por célula, 27,8%, bem como a mais baixa para bivalentes, 0,9%, e trivalentes, 0,1%. Na planta 3, bem como na planta 1, foram observados todos os 30 cromossomos ocorrendo como univalentes. As frequências de bivalentes, trivalentes e univalentes observadas na planta 3 foram respectivamente 92,8%, 6,1% e 1,1% (Tabela 3).

Foi observado um alto grau de variação entre as cinco plantas estudadas quanto a proporção de meiose redutiva e não redutiva na segunda telófase e em tétrades (Tabela 4). A planta 5 exibiu o maior grau de variação entre as cinco plantas estudadas quanto a proporção de meiose redutiva (87,5%) baseado na telófase II e de 73,6% baseado na fase de tétrades. As plantas 2 e 3 demonstraram os maiores índices de meiose não redutiva (95,7% e 97,5%) respectivamente, baseados na telófase II e de 97,3% e 93,0% baseados na fase de tétrades. Embora divisões redutivas ou não redutivas possam predominar numa determinada região da antera, os dois tipos foram frequentemente encontrados em associação (Figuras 36 e 37).

Os graus de pareamento nas seis plantas (Tabela 2) estudadas também podem ser comparados com base no número mínimo de quiasmas por célula assumindo-se números mínimos de zero para univalentes, um para bivalentes e dois por trivalentes. Na base desta comparação, as médias mais altas de quiasmas por célula ocorrem nas plantas 5 (15,1%) e 6 (15,0%) e a mais baixa na planta 3 (1,1%). As células individuais com o valor mais baixo de quiasma zero seriam aquelas das plantas 1 e 3 com todos os cromossomos ocorrendo como univalentes.



As células com os valores de quiasma mais alto (20) seriam aquelas das plantas 5 e 6 com 10 trivalentes.

Todas as células observadas durante a prófase de meiose exibiram 1, 2 ou 3 nucléolos, sendo a presença de 1 nucléolo a condição mais freqüente e a de 3 a menos freqüente. Assim, das 398 células analisadas quanto ao pareamento cromossômico, 356 (89,4%) apresentaram um único nucléolo, 41 (10,3%) dois e 1 (0,3%), três nucléolos.

Quando dois nucléolos estão presentes o tamanho deles pode ser aproximadamente igual ou notadamente diferentes.

Os cromossomos, durante a fase de prófase, quando ainda incompletamente condensados, revelaram regiões heterocromáticas (Figura 38).

Microsporogênese em Eupatorium aqualidum.
 $2n = 3x = 30.$



Figuras de 16 a 38. Microsporogênese em *Eupatorium squalidum*,
 $2n = 3x = 30$.

Figura 16. Diacinese com 30 univalentes. X 2031.

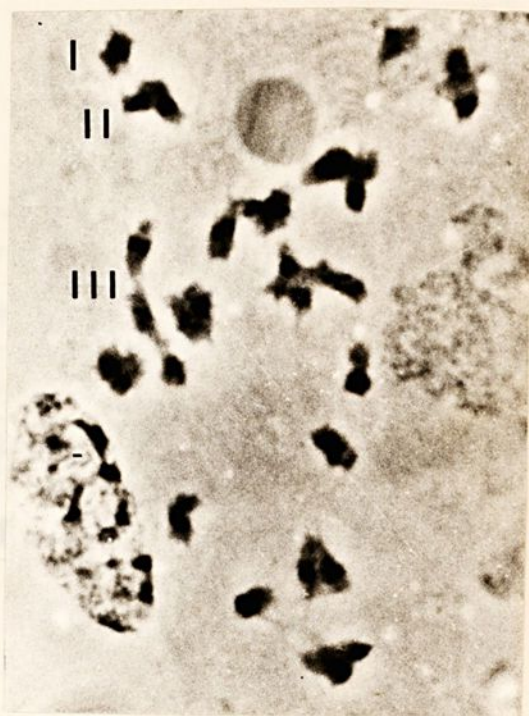
Figura 17. Diacinese com 6 univalentes, 6 bivalentes e 4 trivalentes. X 2031.

Figura 18. Diacinese com 4 univalentes, 4 bivalentes e 6 trivalentes. X 1875.

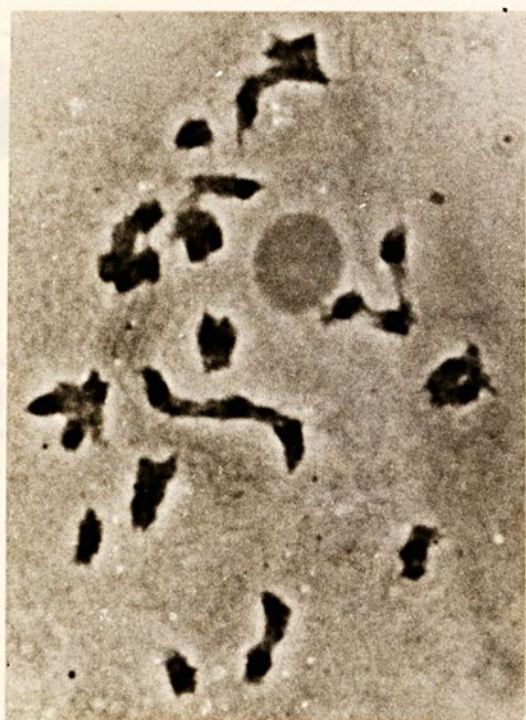
Figura 19. Diacinese com 1 univalente, 1 bivalente e 9 trivalentes. X 2188.



16



17



18



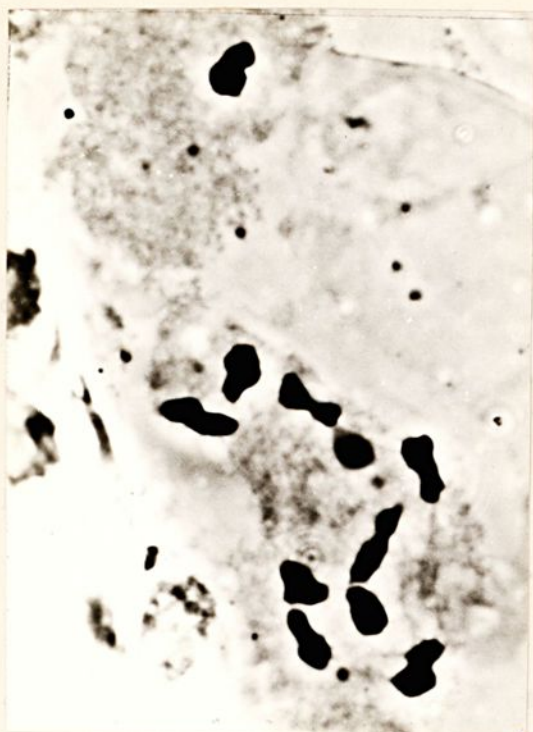
19

Figura 20. Diacinese em fase adiantada com 10 trivalentes.
X 1719.

Figura 21. Metáfase I com cromossomos não alinhados.
X 1875.

Figura 22. Anáfase I com disjunção precoce das cromátides.
X 2032.

Figura 23. Anáfase I com cromossomos retardatários.
X 2188.



20



21



22



23

Figura 24. Anáfase I mostrando 14 cromossomos num dos pólos e 16 no outro. X 2188.

Figura 25. Anáfase I com 11 cromossomos num pólo e 19 no outro. X 1875.

Figura 26. Anáfase II com cromossomos retardatários.
X 1313.

Figura 27. Anáfase II com dois grupos maiores e dois menores de cromossomos. X 1406.



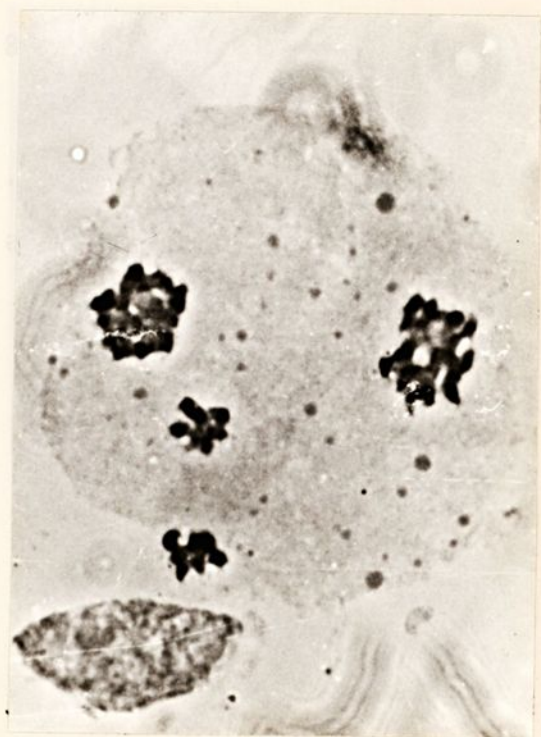
24



25



26



27

Figura 28. Anáfase I mostrando divisão normal e de restituição. X 1250.

Figura 29. Anáfase II. Divisão de restituição com 30 cromossomos em cada pólo. X 1875.

Figura 30. Díade de micrôsporos resultante de divisão não reductiva. X 875.

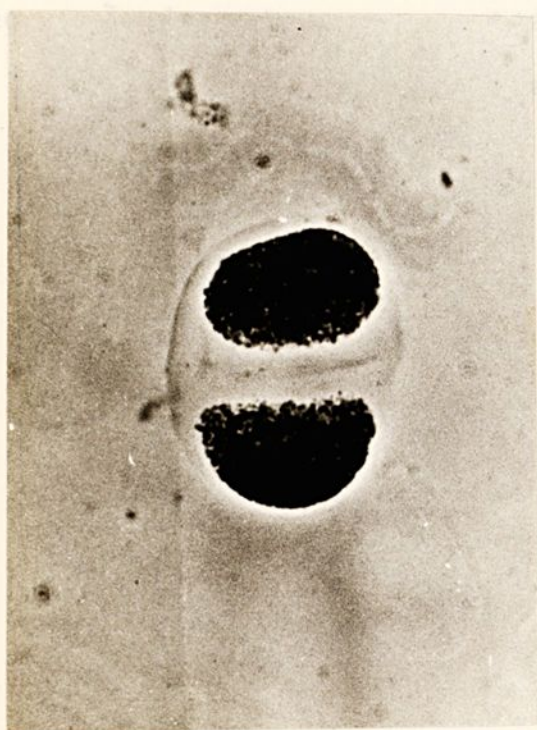
Figura 31. Anáfase II. Grupos de cromossomos em contato e retardatários sendo excluídos. X 1188.



28



29



30



31

Figura 32. Tétrade de micrósporos com dois micrósporos supernumerários. X 1375.

Figura 33. Tríade de micrósporos. X 875.

Figura 34. Díade de micrósporos com um micrósporo supernumerário. X 875.

Figura 35. Díade de micrósporos com quatro micrósporos supernumerários. X 875.



32



33



34



35

Figura 36. Segunda divisão redutiva e não redutiva respectivamente células inferiores e superiores. X 1250.

Figura 37. Tétrades (divisão redutiva) e díade (divisão não redutiva) de micrôsporos ocorrendo em associação. X 800.

Figura 38. Diacinese com cromossomos manifestando regiões heterocromáticas. X 2184.



36



37



38

Tabela 2: Frequências de associações cromossômicas univalentes, bivalentes, trivalentes e de quiasmas por célula.

Planta	Número de células examinadas	Univalentes		Bivalentes		Trivalentes		Quiasmas por célula	
		Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média
1	55	2-30	19,5	0-10	3,8	0- 8	0,9	0-18	5,7
2	93	4-22	10,7	1-10	6,6	0- 8	2,0	4-17	10,7
3	100	8-30	27,8	0-10	0,9	0- 2	0,1	0-10	1,1
4	45	2-24	13,8	1- 9	5,5	0- 8	1,7	3-18	8,8
5	81	0-14	5,0	0-10	4,3	0-10	5,4	9-20	15,1
6	24	0-13	5,0	0- 7	4,6	1-10	5,2	9-20	15,0
Total	398	0-30	15,0	0-10	4,1	0-10	2,2	0-20	8,5



Tabela 3: Frequências de univalentes, bivalentes e trivalentes em diacinese. em tétrades.

Planta	Número de							
	Células	Cromossomos	Univalentes		Bivalentes		Trivalentes	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	55	1650	1071	64,9	426	25,8	153	9,3
2	93	2790	996	35,7	1230	44,1	564	20,2
3	100	3000	2785	92,8	182	6,1	33	1,1
4	45	1350	622	46,1	500	37,0	228	16,9
5	81	2430	406	16,7	710	29,2	1314	54,1
6	24	720	122	16,9	220	30,6	378	52,5
Total	398	11940	6002	50,3	3268	27,4	2670	22,3



Tabela 4: Frequências de fases redutiva e não redutiva na segunda telófase e em tétrades.

Planta	Segunda telófase				Tétrades			
	Redutiva		Não redutiva		Redutiva		Não redutiva	
	Nº	% do total	Nº	% do total	Nº	% do total	Nº	% do total
1	166	30,2	384	69,8	163	32,6	287	63,8
2	10	4,3	223	95,7	21	2,6	746	97,3
3	9	2,5	349	97,5	45	7,0	597	93,0
4	194	38,1	315	61,9	141	56,4	109	43,6
5	554	87,5	79	12,5	270	73,6	97	26,4
Total	933	40,9	1350	59,1	640	25,8	1836	74,2



III.3 - Estudo do Cariótipo

Foram realizadas contagens cromossômicas em pontas de raízes de 116 plântulas. Em 115 o número cromossômico foi determinado como sendo 30. Uma única plântula apresentou 60 cromossomos.

A análise do cariótipo foi realizada em seis células, cada célula representando uma plântula. As Figuras 39 a 41 apresentam três destas células. As medidas cromossômicas estão apresentadas nas Tabelas 5 a 10. Com base nessas medidas foi possível reunir os 30 cromossomos do complemento em 10 grupos, cada grupo contendo 3 cromossomos, indicando ser o complemento cromossômico constituído de um único genoma representado três vezes. As Figuras 42 a 44 apresentam os complementos cromossômicos de três das seis células metafásicas analisadas com os cromossomos presumivelmente homólogos agrupados.

A Tabela 11 caracteriza o genoma da espécie estudada e foi baseado nas médias dos valores obtidos da análise das seis células. Assim, os valores daquela tabela representam 18 cromossomos considerados equivalentes, 3 de cada uma das seis células.

Os resultados da análise de variância, para igualdade das médias dos 10 grupos cromossômicos, foram significativos para as 5 medidas analisadas, indicando diferenças significativas entre os grupos cromossômicos. O braço longo variou de $1,33\mu$ (grupo 9) e $2,11\mu$ (grupo 1), o braço curto de $0,85\mu$ (grupo 7) a $1,39\mu$ (grupo 2) e o comprimento total dos cromossomos variou de $2,40\mu$ (grupos 9 e 10) e $3,05\mu$ (grupo 1). Quanto as proporções entre os braços, os valores extremos foram $1,25\mu$ (grupo 9) e $2,24\mu$ (grupo 1) e, para os cromossomos de cada gru

po em relação ao comprimento total do complemento, os extremos foram $9,04\mu$ (grupos 9 e 10) e $11,48\mu$ (grupo 1).

Nas Tabelas 5 a 10, a ordem dos cromossomos foi feita na base no comprimento. Porém, tanto o comprimento do cromossomo quanto a posição do centrômero foram utilizados no processo de reconhecer cromossomos equivalentes das seis células analisadas visando a caracterização do genoma.

Quanto ao tamanho, todos os cromossomos são pequenos, medindo entre $2,40\mu$ ($1,95$ a $2,67$) e $3,05\mu$ ($2,67$ a $3,65$). O comprimento total do genoma é de $26,54\mu$ e o comprimento dos complementos cromossômicos das seis células ou tiveram um coeficiente de variação de $72,3\mu$ a $90,4\mu$.

A proporção dos braços longo e curto quanto a posição do centrômero foi baseada no esquema de DYER (1979), onde $1:1$ = metacêntrico, $3:1$ = submetacêntrico e $1:0$ = telocêntrico.

Quanto a posição do centrômero são todos submetacêntricos. O cromossomo mais próximo de ser acrocêntrico é o cromossomo número 1, com a proporção dos braços de $2,24$, e o cromossomo mais próximo de ser metacêntrico é o cromossomo número 2, com a proporção de $1,13$. Devido ao seu maior comprimento e a contrastante posição dos seus centrômeros, os cromossomos 1 e 2 são os mais facilmente distinguíveis do genoma. Considerando apenas comprimento, cromossomos 1 e 2 podem ser confundidos pois o cromossomo número 2 pode alcançar ou até superar o comprimento do cromossomo número 1 como é o caso da célula número 6. Nestes casos, a posição do centrômero permite a identificação correta do cromossomo. Os demais cromossomos do genoma são mais difíceis de serem identificados em consequência de sua menor diferenciação morfológica, como indicam os cariótipos apresentados nas Figuras 42 a 44 e o idiograma do genoma

(Figura 45).

Os satélites são raramente visíveis no grau de condensação cromossômica mais favorável para a realização de medidas. Porém, quando visíveis, os satélites ocorrem em cromossomos de comprimento intermediário. Com um menor grau de condensação cromossômica os satélites se tornam mais evidentes, o que possibilita verificar a existência de três cromossomos SAT no complemento. O menor grau de condensação cromossômica também permite observar que todos os cromossomos do complemento possuem uma região de heterocromatina centromérica marcada (Figura 46).

Figuras 39 a 46. Cariótipo de *Eupatorium aequilifolium*.

Figuras 39 a 46. Cariótipo de *Eupatorium squalidum*.

Figuras 39, 40 e 41. Três células de ponta de raiz em metáfase. Cada uma delas mostrando 30 cromossomos. X 3750.

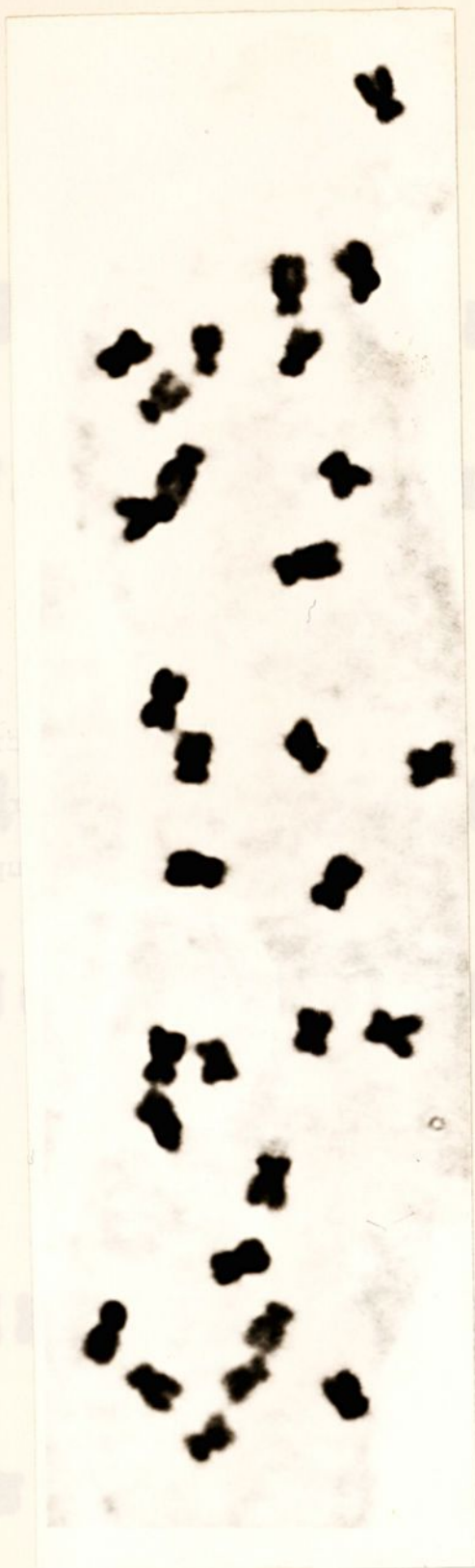


39



40





41

Figuras 42, 43 e 44. Complementos cromossômicos de três células com cromossomos considerados homólogos agrupados. A escala representa 5 μ .



111 222 333 444 555

42

666 777 888 999 000

—

111 222 333 444 555

43

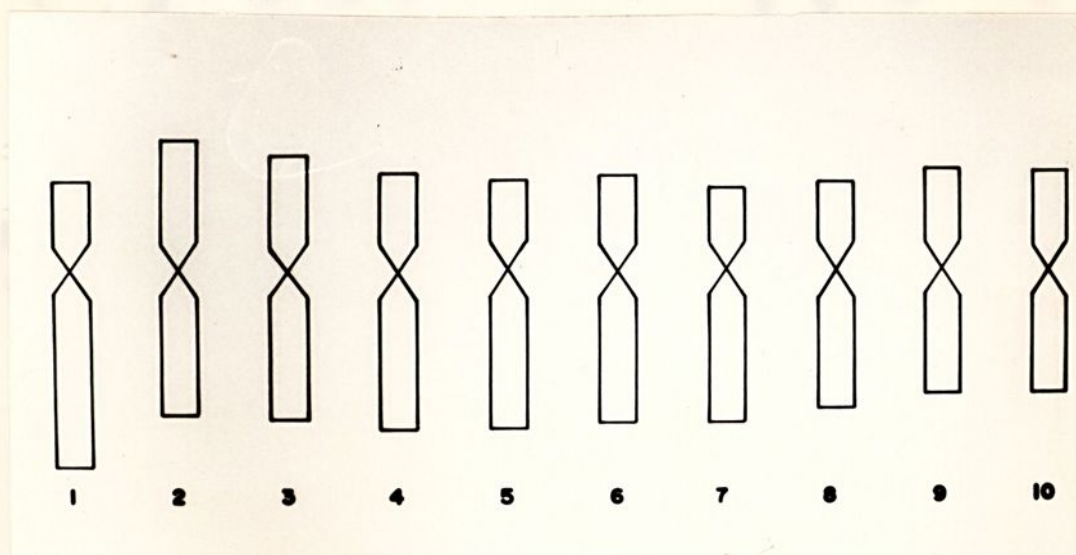
666 777 888 999 000

111 222 333 444 555

44

666 777 888 999 000

Figura 45. Idiograma do genoma de *Eupatorium squalidum*.



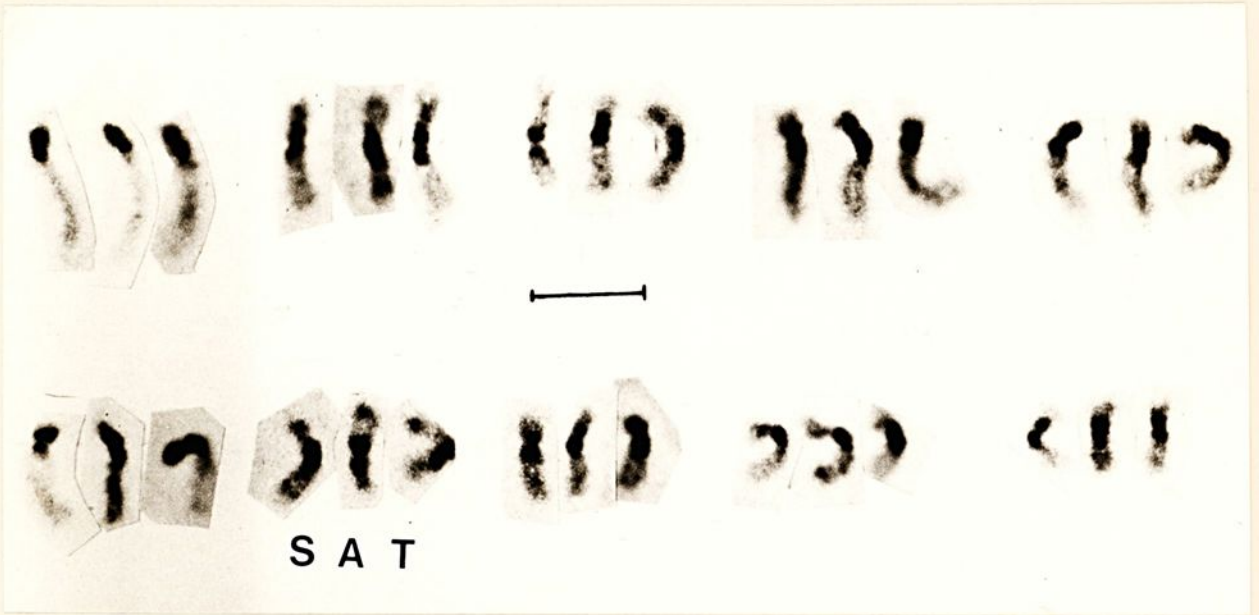
45

Figura 46. Cromossomos mitóticos apresentando heterocromatina centromérica. A medida indicada representa 5 μ .



Tabela 3: Medidas (μ) de cromossomos (a, b, c) dos 10 grupos cromossômicos, considerados os braços longos (L) e curtos (C) na célula 1. (comprimento total da complementação: 39,4)

Grupo	Braco cromossômico	Comprimento	Proporção	Comprimento
	(L)	(C)	dos braços	relativo 1
			(L/C)	



46

Tabela 5: Medidas (μ) de cromossomos (a, b, c) dos 10 grupos cromossômicos, considerados os braços longos (L) e curtos (C) na célula 1. (comprimento total do complemento: 90,4)

Grupo	Braço cromossômico		Comprimento total (L+C)	Proporção dos braços (L/C)	Comprimento relativo %
	(L)	(C)			
1 a	2,67	0,99	3,66	2,70	4,04
1 b	2,53	0,93	3,46	2,72	3,83
1 c	2,32	0,93	3,25	2,49	3,60
2 a	2,00	1,39	3,39	1,44	3,75
2 b	2,00	1,33	3,33	1,50	3,69
2 c	2,00	1,28	3,28	1,56	3,63
3 a	2,00	1,20	3,20	1,67	3,54
3 b	2,00	1,20	3,20	1,67	3,54
3 c	2,00	1,20	3,20	1,67	3,54
4 a	1,68	1,55	3,23	1,09	3,57
4 b	1,73	1,47	3,20	1,18	3,54
4 c	1,60	1,47	3,07	1,09	3,39
5 a	2,00	1,07	3,07	1,88	3,39
5 b	2,00	1,07	3,07	1,88	3,39
5 c	2,00	1,07	3,07	1,88	3,39
6 a	2,00	1,07	3,07	1,88	3,39
6 b	1,87	1,20	3,07	1,56	3,39
6 c	1,87	1,07	2,93	1,75	3,25
7 a	1,92	1,07	2,99	1,80	3,30
7 b	1,87	1,09	2,96	1,71	3,27
7 c	1,89	1,01	2,90	1,87	3,22
8 a	1,73	1,07	2,80	1,63	3,10
8 b	1,87	0,93	2,80	2,00	3,10
8 c	1,73	0,80	2,53	2,17	2,80
9 a	1,60	1,09	2,69	1,46	2,98
9 b	1,60	1,07	2,67	1,50	2,95
9 c	1,60	1,07	2,67	1,50	2,95
10 a	1,47	1,20	2,67	1,22	2,95
10 b	1,47	1,20	2,67	1,22	2,95
10 c	1,33	0,99	2,32	1,35	2,57

Tabela 6: Medidas (μ) de cromossomos (a, b, c) dos 10 grupos cromossômicos, considerados os braços longos (L) e curtos (C) na célula 2. (comprimento total do complemento: 84,2)

Grupo	Braço cromossômico		Comprimento total (L+C)	Proporção dos braços (L/C)	Comprimento relativo %	
	(L)	(C)				
1	a	2,27	1,07	3,34	2,13	3,96
	b	2,16	1,04	3,20	2,08	3,81
	c	2,13	1,01	3,14	2,11	3,74
2	a	1,73	1,60	3,33	1,08	3,96
	b	1,73	1,47	3,20	1,18	3,81
	c	1,63	1,47	3,00	1,11	3,68
3	a	1,87	1,33	3,20	1,40	3,81
	b	1,73	1,39	3,12	1,25	3,71
	c	1,73	1,33	3,06	1,30	3,65
4	a	1,92	1,09	3,01	1,76	3,58
	b	1,89	1,09	2,99	1,73	3,55
	c	1,92	1,01	2,93	1,89	3,49
5	a	1,73	1,09	2,82	1,59	3,36
	b	1,68	1,07	2,75	1,58	3,27
	c	1,65	1,07	2,72	1,55	3,24
6	a	1,87	0,93	2,80	2,00	3,33
	b	1,73	0,93	2,66	1,86	3,17
	c	1,68	0,93	2,61	1,80	3,11
7	a	1,47	1,20	2,67	1,22	3,17
	b	1,39	1,17	2,56	1,18	3,04
	c	1,47	1,07	2,54	1,38	3,01
8	a	1,55	1,23	2,78	1,26	3,30
	b	1,36	1,07	2,43	1,28	2,89
	c	1,33	1,07	2,40	1,25	2,85
9	a	1,63	0,88	2,51	1,85	2,98
	b	1,68	0,80	2,48	2,10	2,95
	c	1,63	0,83	2,46	1,94	2,92
10	a	1,55	1,01	2,56	1,53	3,04
	b	1,52	0,93	2,45	1,63	2,92
	c	1,47	0,93	2,40	1,57	2,85

Tabela 7: Medidas (μ) de cromossomos (a, b, c) dos 10 grupos cromossômicos, considerados os braços longos (L) e curtos (C) na célula 3. (comprimento total do complemento: 78,8)

Grupo		Braço cromossômico		Comprimento total (L+C)	Proporção dos braços (L/C)	Comprimento relativo %
		(L)	(C)			
1	a	2,13	0,93	3,06	2,29	3,89
	b	2,13	0,93	3,06	2,29	3,89
	c	2,00	0,93	2,93	2,14	3,72
2	a	1,60	1,47	3,07	1,09	3,89
	b	1,60	1,33	2,93	1,20	3,72
	c	1,60	1,33	2,93	1,20	3,72
3	a	1,73	1,20	2,93	1,44	3,72
	b	1,73	1,20	2,93	1,44	3,72
	c	1,65	1,09	2,74	1,51	3,49
4	a	2,00	0,93	2,93	2,14	3,72
	b	1,87	0,93	2,80	2,00	3,55
	c	1,87	0,88	2,75	2,12	3,49
5	a	1,47	1,07	2,54	1,38	3,21
	b	1,47	1,07	2,54	1,38	3,21
	c	1,47	1,07	2,54	1,38	3,21
6	a	1,79	0,99	2,78	1,81	3,52
	b	1,60	0,93	2,53	1,71	3,21
	c	1,60	0,93	2,53	1,71	3,21
7	a	1,73	0,80	2,53	2,17	3,21
	b	1,60	0,80	2,40	2,00	3,05
	c	1,60	0,80	2,40	2,00	3,05
8	a	1,33	1,20	2,53	1,11	3,21
	b	1,33	1,07	2,40	1,25	3,05
	c	1,25	1,01	2,26	1,25	2,88
9	a	1,47	0,93	2,40	1,57	3,05
	b	1,47	0,80	2,27	1,83	2,88
	c	1,33	0,93	2,26	1,43	2,88
10	a	1,47	0,80	2,27	1,83	2,88
	b	1,47	0,80	2,27	1,83	2,88
	c	1,47	0,80	2,27	1,83	2,88

Tabela 8: Medidas (μ) de cromossomos (a, b, c) dos 10 grupos cromossômicos, considerados os braços longos (L) e curtos (C) na célula 4. (comprimento total do complemento: 77,6)

Grupo	Braço cromossômico		Comprimento	Proporção	Comprimento	
	(L)	(C)	total	dos braços	relativo %	
			(L+C)	(L/C)		
1	a	2,13	0,93	3,06	2,29	3,95
	b	1,92	1,07	2,99	1,80	3,85
	c	2,03	0,93	2,96	2,17	3,81
2	a	1,68	1,33	3,09	1,26	3,88
	b	1,55	1,39	2,94	1,12	3,78
	c	1,47	1,33	2,80	1,10	3,16
3	a	1,73	1,07	2,80	1,63	3,61
	b	1,73	1,07	2,80	1,63	3,61
	c	1,73	0,93	2,66	1,86	3,44
4	a	1,39	1,33	2,72	1,04	3,51
	b	1,33	1,20	2,53	1,11	3,26
	c	1,31	1,12	2,43	1,17	3,13
5	a	1,60	0,96	2,56	1,67	3,30
	b	1,60	0,96	2,56	1,67	3,30
	c	1,60	0,96	2,56	1,67	3,30
6	a	1,65	0,93	2,58	1,77	3,30
	b	1,63	0,96	2,59	1,69	3,33
	c	1,49	0,93	2,42	1,60	3,13
7	a	1,52	1,09	2,61	1,39	3,37
	b	1,47	1,07	2,54	1,38	3,26
	c	1,39	1,07	2,46	1,30	3,16
8	a	1,49	0,93	2,42	1,60	3,13
	b	1,47	0,93	2,40	1,57	3,09
	c	1,47	0,93	2,40	1,57	3,09
9	a	1,47	0,85	2,32	1,72	2,99
	b	1,47	0,85	2,32	1,72	2,99
	c	1,47	0,83	2,20	1,77	2,96
10	a	1,33	1,07	2,40	1,25	3,09
	b	1,23	1,07	2,20	1,15	2,96
	c	1,20	0,96	2,16	1,25	2,78

Tabela 9: Medidas (μ) de cromossomos (a, b, c) dos 10 grupos cromossômicos, considerados os braços longos (L) e curtos (C) na célula 5. (comprimento total do complemento: 74,4)

Grupo	Braço cromossômico		Comprimento total (L+C)	Proporção dos braços (L/C)	Comprimento relativo %	
	(L)	(C)				
1	a	2,03	0,93	2,96	2,17	3,98
	b	2,03	0,93	2,96	2,17	3,98
	c	1,87	0,83	2,70	2,26	3,62
2	a	1,60	1,20	2,80	1,33	3,76
	b	1,60	1,20	2,80	1,33	3,76
	c	1,60	1,07	2,67	1,50	3,58
3	a	1,49	1,33	2,82	1,12	3,80
	b	1,33	1,33	2,66	1,00	3,58
	c	1,33	1,20	2,53	1,11	3,41
4	a	1,73	0,88	2,61	1,97	3,51
	b	1,68	0,85	2,53	1,97	3,41
	c	1,65	0,85	2,50	1,94	3,37
5	a	1,73	0,93	2,66	1,86	3,58
	b	1,60	0,85	2,45	1,88	3,30
	c	1,60	0,83	2,43	1,94	3,26
6	a	1,60	0,88	2,48	1,82	3,33
	b	1,52	0,93	2,45	1,63	3,30
	c	1,52	0,93	2,45	1,63	3,30
7	a	1,65	0,80	2,45	2,07	3,30
	b	1,65	0,80	2,45	2,07	3,30
	c	1,65	0,80	2,45	2,07	3,30
8	a	1,33	1,01	2,34	1,32	3,15
	b	1,36	0,99	2,35	1,38	3,15
	c	1,41	0,93	2,35	1,51	3,15
9	a	1,23	0,96	2,19	1,28	2,94
	b	1,23	0,93	2,16	1,31	2,90
	c	1,15	0,93	2,08	1,23	2,80
10	a	1,33	0,80	2,13	1,67	2,87
	b	1,20	0,80	2,00	1,50	2,69
	c	1,20	0,75	1,95	1,56	2,62

Tabela 10: Medidas (μ) de cromossomos (a, b, c) dos 10 grupos cromossômicos, considerados os braços longos (L) e curtos (C) na célula 6. (comprimento total do complemento: 72,3)

Grupo	Braço cromossômico		Comprimento	Proporção	Comprimento
	(L)	(C)	total (L+C)	dos braços (L/C)	relativo %
1 a	1,47	1,33	2,80	1,10	3,85
1 b	1,60	1,20	2,80	1,33	3,85
1 c	1,33	1,33	2,66	1,00	3,67
2 a	1,87	0,93	2,80	2,00	3,85
2 b	1,87	0,80	2,67	2,33	3,67
2 c	1,87	0,80	2,67	2,33	3,67
3 a	1,60	1,07	2,67	1,50	3,67
3 b	1,60	1,07	2,67	1,50	3,67
3 c	1,60	0,93	2,53	1,71	3,49
4 a	1,60	0,93	2,53	1,71	3,49
4 b	1,60	0,93	2,53	1,71	3,49
4 c	1,60	0,93	2,53	1,71	3,49
5 a	1,47	0,93	2,40	1,57	3,30
5 b	1,47	0,93	2,40	1,57	3,30
5 c	1,47	0,93	2,40	1,57	3,30
6 a	1,47	1,07	2,54	1,38	3,49
6 b	1,47	0,93	2,40	1,57	3,30
6 c	1,33	0,93	2,26	1,43	3,12
7 a	1,33	1,07	2,40	1,25	3,30
7 b	1,33	1,07	2,40	1,25	3,30
7 c	1,20	1,07	2,27	1,13	3,12
8 a	1,47	0,80	2,27	1,83	3,12
8 b	1,47	0,80	2,27	1,83	3,12
8 c	1,47	0,80	2,27	1,83	3,12
9 a	1,20	0,93	2,13	1,29	2,94
9 b	1,20	0,93	2,13	1,29	2,94
9 c	1,20	0,93	2,13	1,29	2,94
10 a	1,20	0,93	2,00	1,29	2,94
10 b	1,07	0,93	2,00	1,14	2,75
10 c	1,07	0,93	2,00	1,14	2,75

Tabela 11: Médias ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$, em μ) dos braços longo (L) e curto (C) de 18 cromossomos das 6 células estudadas. Comprimento total médio do complemento: $26,54 \pm 0,79$ (F para igualdade das médias; **: $P < 0,01$).

Cromossomo	L	C	L+C	L/C	$\frac{L+C}{26,54 \pm 0,79}$
1	$2,11 \pm 0,05$	$0,93 \pm 0,02$	$3,05 \pm 0,06$	$2,24 \pm 0,05$	$11,48 \pm 0,06$
2	$1,56 \pm 0,03$	$1,39 \pm 0,03$	$2,95 \pm 0,05$	$1,13 \pm 0,02$	$11,15 \pm 0,17$
3	$1,64 \pm 0,06$	$1,19 \pm 0,03$	$2,83 \pm 0,08$	$1,37 \pm 0,03$	$10,63 \pm 0,28$
4	$1,73 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,03$	$2,71 \pm 0,08$	$1,77 \pm 0,02$	$10,19 \pm 0,32$
5	$1,71 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,02$	$2,65 \pm 0,05$	$1,84 \pm 0,04$	$10,00 \pm 0,22$
6	$1,64 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,02$	$2,64 \pm 0,05$	$1,66 \pm 0,02$	$9,93 \pm 0,02$
7	$1,65 \pm 0,04$	$0,85 \pm 0,02$	$2,51 \pm 0,05$	$1,94 \pm 0,04$	$9,47 \pm 0,30$
8	$1,50 \pm 0,05$	$0,93 \pm 0,03$	$2,43 \pm 0,07$	$1,60 \pm 0,03$	$9,14 \pm 0,27$
9	$1,33 \pm 0,04$	$1,07 \pm 0,03$	$2,40 \pm 0,06$	$1,25 \pm 0,03$	$9,04 \pm 0,21$
10	$1,35 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,02$	$2,40 \pm 0,05$	$1,30 \pm 0,02$	$9,04 \pm 0,18$
$F_{9;170}$	26,89**	39,80**	13,40**	113,16**	39,06**

III.4 - Germinação e Produção de Sementes; Observações de

Campo *E. bupleurifolium* $2n = 3x = 30$

5 - *E. inaeifolium* $2n = 4x = 40$

Os resultados dos testes de germinação de sementes retiradas de 13 plantas revelaram porcentagens de germinação variando de 0,0% a 42,9%. Das 910 sementes testadas, 198 (21,8%) germinaram (Tabela 12). Dentro dos objetivos deste trabalho não foi considerado definir os fatores envolvidos na germinação embora incompatibilidade de sementes, dormência, de geração do endosperma, diferenças genéticas, entre outras, possam impedir a germinação. Porém, foi constatada a presença de embrião nas sementes semeadas.

A produção de sementes, à partir de plantas submetidas a diferentes tratamentos no campo (Tabela 13) variou com o tratamento das 24 plantas marcadas, 6 tiveram suas flores emasculadas no estágio de botão e em seguida ensacadas; das 530 flores examinadas, nenhuma produziu sementes. Das 670 flores não emasculadas e não ensacadas, de 9 plantas, 187 (27,9%) produziram sementes. Das 1471 flores controle (não emasculadas e não ensacadas), de 9 plantas, 825 (56,1%) produziram sementes.

Observações de plantas em populações naturais não revelaram nenhuma atividade por parte de polinizadores. Muito raramente, um polinizador em potencial pousava num capítulo, porém, logo a seguir, abandonava a planta.

Segundo COLEMAN, 1986 (comunicação pessoal) na região de São José do Rio Preto, *E. squalidum* foi observada ocorrendo em populações mixtas ou em grande proximidade com as seguintes espécies:

1 - *E. polystachium* $2n = 2x = 20$

2 - *E. inaeifolium* $2n = 3x = 30$



3 - <i>E. callilepsis</i>	$2n = 3x = 30$
4 - <i>E. bupleurifolium</i>	$2n = 3x = 30$
5 - <i>E. ivaefolium</i>	$2n = 4x = 40$
6 - <i>E. odoratum</i>	$2n = 6x = 60$
7 - <i>E. laevigatum</i>	$2n = 6x = 60$
8 - <i>E. purpurascens</i>	$2n = 6x = 60$

Com a excessão de *E. bupleurifolium* todas estas espécies tem a época de floração pelo menos parcialmente coincidente com aquela de *E. squalidum*.



Tabela 12: Germinabilidade em *Eupatorium squalidum*.

Planta nº	Sementes germinadas	
	Nº	%
1	11	15,7
2	18	25,7
3	30	42,9
4	19	27,1
5	21	30,0
6	19	27,1
7	24	34,3
8	13	18,6
9	14	20,0
10	27	38,6
11	0	0,0
12	2	2,9
13	0	0,0
Totais	198	21,8

Tabela 13: Produção de sementes por flores ensacadas e não ensacadas de *Eupatorium squalidum*.

Planta	Flores ensacadas						Flores não ensacadas		
	Não emasculadas			Emasculadas					
	Nº de aquênios com embrião	Nº de aquênios sem embrião	% de aquênios com embrião	Nº de aquênios com embrião	Nº de aquênios sem embrião	% de aquênios com embrião	Nº de aquênios com embrião	Nº de aquênios sem embrião	% de aquênios com embrião
1	45	30	60,0	-	-	-	124	56	68,9
2	43	25	63,2	-	-	-	87	60	59,2
3	32	51	38,6	0	123	0	121	42	74,2
4	8	76	9,5	0	95	0	125	105	54,3
5	17	83	17,0	0	111	0	115	169	40,5
6	19	26	42,2	-	-	-	99	68	59,3
7	9	22	29,0	0	97	0	69	69	50,0
8	10	104	8,8	0	53	0	59	59	50,0
9	4	66	5,7	0	51	0	26	18	59,1
Totais	187	483	27,9	0	530	0	825	646	56,1

Total geral 2671 aquênios



IV - DISCUSSÃO

IV.1 - Estudos Embriológicos

A ocorrência regular de embriões em óvulos de flores ainda em fase de pré-antese (Tabela 1) e portanto impossibilita dos de terem sido polinizados, é um forte indício de apomixia na espécie *Eupatorium squalidum*. Como já mencionado, há três possibilidades quanto ao tipo de apomixia: a embrionia adventícia, a aposporia e a diplosporia.

O fato de não ter sido observado em nenhum óvulo examinado, a formação de saco embrionário à partir de célula somática do tipo apospórico ou de início de embriões formados diretamente à partir de células somáticas do tipo embrionia adventícia, eliminou-se a possibilidade de ser a apomixia em *E. squalidum* um daqueles tipos. Também, nenhum óvulo mostrou a presença de tétrades de megásporos o que sugere a perda ou modificação da meiose na megasporogênese. A constatação de que o saco embrionário maduro resulta de três divisões sucessivas do núcleo do megasporócito, que funciona como megásporo (Figuras 1 a 7), concluiu-se que o tipo de apomixia em questão é a diplosporia. Segundo NOGLER (1984) são observados três tipos de diplosporia que são: *Taraxacum*, *Ixeris* e *Antennaria*. Os dois primeiros tipos são caracterizados pela formação de núcleos de restituição na primeira divisão meiótica e dois núcleos não reduzidos na segunda divisão. No tipo *Ixeris* os dois núcleos não reduzidos entram diretamente na formação do saco embrionário, enquanto que no tipo *Taraxacum* forma-se uma parede entre os dois núcleos não reduzidos, um deles degenerando e o outro dando origem ao saco embrionário. No tipo *Antennaria* a divisão meiótica é substituída por divisão mitótica do núcleo do megasporócito. GUSTAFSSON (1947) sugeriu que os tipos de diplosporia po

deriam ser condicionados por fatores ambientais, posteriormente confirmada por SPARVOLI (1960) trabalhando com *Eupatorium riparium*. O autor observou que clones de uma única planta exibiram diplosporia do tipo *Antennaria* ou do tipo *Taraxacum* ou até meiose completa dependendo do ambiente de cultivo.

O tipo de diplosporia provável em *E. squalidum* é o *Antennaria*. Esta conclusão foi baseada no fato de não ter sido observado nenhum megasporócito com núcleo em forma de haltere, característico de núcleo de restituição (Figura 28). Também, não foi observada separação por uma parede celular dos dois núcleos iniciais, característico do tipo *Taraxacum*. Diplosporia do tipo *Antennaria* foi registrada previamente em *E. glandulosum* (HOLMGREN, 1919) e *E. callilepsis* (COLEMAN E COLEMAN, 1984).

Quanto à formação do endosperma em *Eupatorium squalidum*, a sua presença em óvulos examinados em fase de pré-ântese demonstra ser do tipo antônomo, ou seja, independente de fecundação. O desenvolvimento antônomo do endosperma ocorre na maioria das espécies apomíticas da família Compositae enquanto que em outras famílias é uma condição esporádica (NOGLER, 1984). A iniciação autônoma do endosperma pode ser a partir de núcleos polares livres ou a partir do núcleo central. STEBBINS & JENKINS (1939) observaram endosperma $2n$ e $4n$ em *Crepis* originados respectivamente de núcleos polares livres ou fundidos. As observações embriológicas de *Eupatorium squalidum* demonstraram que os dois núcleos polares se unem e que o endosperma se inicia a partir do núcleo central resultante (Tabela 1 e Figura 9). Como os núcleos polares são diploides com $2n=30$, o endosperma originado da união daqueles núcleos será necessariamente tetraplóide com $4n=60$.

GUSTAFSSON (1946) reconheceu três estágios que condu



zem à plena assexualidade do endosperma nas espécies com desenvolvimento autônomo. No estágio em que ele considerou primário, os núcleos polares se fundem antes da iniciação do endosperma. Este estágio é apresentado por *Eupatorium squalidum*, além de ocorrer também em *Eupatorium bupleurifolium* (COLEMAN & COLEMAN, 1984), *Alchemilla* sp. (MÜRBECK, 1902), *Eurigeron ramosus* (HOLMGREN, 1919), *Chondrilla* sp. (PODDUBNAJA-ARNOLDI, 1933), *Taraxacum* sp. e *Elastotema* (FAGERLIND, 1944), entre outros.

No próximo estágio, os núcleos polares as vezes se fundem e as vezes não, assim podendo produzir endosperma $2n$ ou $4n$. Esta condição é conhecida em *Eupatorium glandulosum* (HOLMGREN, 1919) *Ixeris dentata* (OKABE, 1932) e *Crepis* (STEBBINS & JENKINS, 1939).

Plena assexualidade ocorre quando os núcleos polares não se fundem antes da formação do endosperma, condição encontrada em *Eupatorium callilepsis* (COLEMAN & COLEMAN, 1984). Portanto os tres graus de assexualidade ocorre no gênero *Eupatorium*.

Nas espécies sexuadas e em muitas espécies apomíticas pseudogâmicas ou autônomas, o desenvolvimento do endosperma precede o início de formação do embrião. Porém, outras espécies apomíticas autônomas ou pseudogâmicas podem apresentar situação inversa, ou seja, a formação do embrião precede a formação do endosperma como é o caso de *Eupatorium squalidum* e *Eupatorium glandulosum* (HOLMGREN, 1919). No caso de embrionia precoce isto é, a formação de embrião ainda em fase de botão, das espécies pseudogâmicas, a formação do endosperma é necessariamente retardada até ântese, para fecundação dos núcleos polares. Porém, nas espécies autônomas a formação de ambos, embrião e endosperma, pode ser iniciada na fase de botão, como

ocorre em *E. squalidum*, *E. bupleurifolium* e *E. callilepsis* (COLEMAN & COLEMAN, 1984), *Hieracium* (SKALINSKA, 1973), *Taraxacum* (MALECKA, 1971).

A embrionia precoce, com o desenvolvimento do embrião ainda em fase de botão, elimina a possibilidade da sua formação através de fecundação. No caso de *Eupatorium squalidum* apenas 20% dos óvulos em fase de pré-floração apresentavam ainda oosferas (Tabela 1). Considerando que uma grande parte dos óvulos examinados em fase de pré-floração foram coletados várias horas antes da ântese, a porcentagem de óvulos apresentando oosferas no momento exato da ântese teria sido consideravelmente menor. As observações realizadas durante a fase de ântese mostraram a presença de oosferas em apenas 2% dos óvulos (Tabela 1). Estes resultados demonstram que na espécie *E. squalidum* a embrionia precoce representa uma barreira quase absoluta à reprodução sexuada. Esta conclusão é apoiada pelo fato de que nenhum dos 1377 óvulos examinados nas fases de pré-ântese, ântese e pós-ântese acusaram a presença de tubo polínico embora 1114 (80,9%) apresentassem embrião. Portanto a prevalência da embrionia precoce e a ausência de tubos polínicos indicam ser a reprodução do material examinado de *E. squalidum*, exclusivamente apomítico. Evidentemente, níveis de reprodução sexuada extremamente baixos poderiam ter passado despercebidos. Também existe a possibilidade da espécie apresentar maiores graus de sexualidade em outras populações. Evidências de sexualidade têm sido encontradas em espécies previamente consideradas apomíticas obrigatórias, como por exemplo, *Ranunculus auricomus* e *R. cassubicus* (MARKLUND & ROUSI, 1961, ISMAILOV, 1970, 1976), *Taraxacum* sect. *Palustria* (FÜRNKRANZ, 1961, MALECKA, 1973) e *Hieracium aurantiacum* (SKALINSKA, 1973, 1976). Porém, mesmo levando em consideração es-



ses casos e respeitando a tendência atual de questionar teoricamente a existência da apomixia obrigatória, concluiu-se no caso de *E. squalidum* após estudos embriológicos realizados, ser o sistema genético da espécie altamente fechado.

IV.2 - Estudo da Microsporogênese

Previamente, outras três espécies do gênero foram estudadas quanto a microsporogênese: *E. bupleurifolium*, *E. callilepsis* (COLEMAN & COLEMAN, 1984) e *E. glandulosum* (HOLMGREEN, 1919). Nesta última espécie, um triplóide ($2n=3x=51$), diplospórico autônoma, HOLMGREEN demonstrou que o comportamento da meiose é influenciado pela posição da flôr no capítulo. Nas flores centrais os cromossomos não pareiam e são altamente contraídos. Na metáfase I, os cromossomos podem se alinhar na placa com a separação das cromátides ocorrendo na anáfase. Em outras ocasiões, os cromossomos ocorrem espalhados sobre o fuso e são distribuídos ao acaso inteiros para os pólos. Outras células demonstraram situações intermediárias. Nas flores periféricas do capítulo, as paredes celulares dos microsporócitos podem desintegrar-se liberando os cromossomos numa matriz citoplasmática, enquanto outras formam até vários bivalentes.

Eupatorium bupleurifolium é uma espécie triplóide ($2n=3x=30$) apospórica autônoma. COLEMAN & COLEMAN (1984) demonstraram que trivalentes predominam durante a prófase de todas as células, podendo também ocorrer bi e univalentes. As fases subsequentes da meiose revelaram as anormalidades esperadas em consequência do pareamento observado, isto é, cromossomos retardatários, distribuição desigual dos cromossomos aos polos durante anáfase e a formação de micronúcleos.



Eupatorium callilepis é triplóide ($2n=3x=30$) diplospórica autônoma. A prófase da meiose da microsporogênese dessa espécie mostra uma grande predominância de univalentes em todas as células, podendo também ocorrer bivalentes ocasionais de cromossomos fracamente associados. Os cromossomos são todos altamente contraídos, assumindo forma esférica mesmo quando pareados. Cromossomos retardatários, núcleos não balanceados e a formação de micronúcleos são frequentes. Núcleos de restituição são comuns e aproximadamente 50% das meioses não são redutivas, resultando na formação de díades de núcleos diplóides (COLEMAN & COLEMAN, 1984).

Com base na associação regular de quase todos os cromossomos do complemento em trivalentes, COLEMAN & COLEMAN (1984) concluíram ser *E. bupleurifolium* um autotriplóide. O não impedimento do pareamento nessa espécie coincide com o comportamento característico das espécies apospóricas (GUSTAFSSON, 1947; STEBBINS, 1950). GUSTAFSSON (1947) baseando-se nas pesquisas de HOLMGREEN (1919), sugeriu aloploidia para *E. glandulosum*.

Levando em consideração que as espécies diplospóricas autônomas tendem a suprimir o pareamento mesmo entre cromossomos comprovadamente homólogos, CHRISTOFF (1940) e COLEMAN & COLEMAN (1984) deixaram de designar o tipo de poliploidia em *E. callelipis*, indicando porém, a necessidade de estudos de cariótipo para melhor definir a situação. *Eupatorium squalidum* apesar de ser também diplospórica autônoma, apresenta o pareamento menos suprimido do que *E. glandulosum* e *E. callelipis*, podendo em determinadas células ocorrerem associados todos os trinta cromossomos em 10 trivalentes (Tabela 2 e Figura 20). Embora não dispensando a necessidade de estudos do cariótipo,



esta observação permite a designação de *E. squalidum* como autotriploide.

A produção de gametas não reduzidos ocorre normalmente até em espécies sexuadas e existem evidências de que esse processo está sob controle genético. No milho, por exemplo, o gene "elongate", localizado no cromossomo três, aumenta a frequência de oosferas não reduzidas (RHOADES, 1956). Também no milho, ALEXANDER & BECKETT (1963) determinaram que a frequência de oosferas não reduzidas varia significativamente entre diferentes linhagens. A frequência entre duas linhagens testadas variou de 0 a 3,5%. A produção de gametas não reduzidos pode ocorrer tanto para a produção de micrósporos como para de megásporos. Porém a fecundações $2n+n$ são mais frequentes que as $n+2n$, pois de uma maneira geral, o pólen diplóide não compete bem com o polen haplóide (HARLAN & WET, 1975). Diante dessas considerações, acredita-se que *Eupatorium squalidum* apomítico e triploide, provavelmente originou-se de populações diplóides sexuadas ($2n=2x=20$) através da fecundação de um gameta feminino não reduzido ($2n=20$) por uma gameta masculino reduzido ($n=10$). É desconhecido se populações sexuadas continuam a existir ou se foram substituídas inteiramente por populações apomíticas. Considerando-se a extensa distribuição geográfica da espécie, que vai desde Santa Catarina até o Amazonas e Pará (LORENZI, 1982), poder-se-ia supor da existência de populações sexuadas. Porém, se a não redução estiver sob controle de um gene de ampla ocorrência e alta penetrância, seria concebível a eliminação total das populações sexuadas.

A grande produção de grãos de pólen vazios e deformados evidencia a alta esterilidade de *E. squalidum*. Redução da



fertilidade é comum em autotriplóides devido à formação e a segregação irregular de trivalentes. Porém, ainda mais crítica do que a formação de trivalentes é a formação de cromossomos retardatários e outros distribuídos nas fases mais avançadas de meiose (SPARROW et alii 1942; MYERS & HILL, 1942; MYERS, 1943), e que são frequentemente encontrados em *E. squavidum*. Devido a pequena probabilidade de formação de núcleos geneticamente balanceados, seria remota a possibilidade de formação de grãos de pólen viáveis por meiose redutiva na espécie estudada. Meiose não redutiva resulta na formação de grãos de pólen triplóide e presumivelmente inviáveis. Porém, a possível viabilidade desses grãos seria prejudicada pela exclusão de alguns dos cromossomos do núcleo de restituição, ocorrência esta evidentemente frequente baseado na presença de micrósporos supernumerários nas díades (Figuras 34 e 35). Com base nessas considerações, conclui-se ser pouco provável a formação de grãos de pólen viáveis em *E. squavidum*.

A formação de núcleos de restituição é fortemente relacionada com a presença de univalentes, tanto em espécies apomíticas (GUSTAFSSON, 1947) como em espécies sexuadas (WAGENAAR, 1968 a; ISLAM & SHEPHERD, 1980) e evidentemente envolve a má função do fuso, uma vez que os cromossomos não são transportados normalmente aos polos. WAGENAAR (1961 a, b) demonstrou, utilizando híbridos de *Triticum*, que a Anáfase I somente se inicia após um determinado número de cromossomos terem se acumulado na placa metafásica. Também, BAJER & MALE-BAJER (1972) demonstraram que os centrômeros podem servir como pontos de ligação dos microtúbulos por tempo limitado. Assim, a anáfase pode falhar se o tempo necessário para o acúmulo do número mínimo de cromossomos na placa for além do período funcio

nal dos centrômeros (ISLAM & SHEPHERD, 1980). Supõe-se que mecanismo similar atua na formação de núcleos de restituição na microsporogênese de *E. squalidum*.

A existência de núcleos de restituição na meiose da microsporogênese de *E. squalidum* não implica na sua presença também na megasporogênese. A micro e a megasporogênese são eventos independentes. Em geral, as espécies diplospóricas autônomas exibem divisões mais regulares na megasporogênese do que as da microsporogênese, sejam elas de caráter mitótico ou de formação de núcleos de restituição. As divisões de caráter mitótico são notáveis pela total eliminação do pareamento e aquelas com núcleos de restituição pela regular e total inclusão de todos os cromossomos nos núcleos diplóides, evitando assim as deficiências (GUSTAFSSON, 1947).

Com base na falta de núcleos de restituição observados através do seu formato típico, isto é, de halteres, conclui-se pela divisão mitótica na megasporogênese de *E. squalidum*. Neste caso, haveria total supressão do pareamento, caso já observado em *E. glandulosum* (HOLMGREN, 1919).

IV.3 - Estudo do Cariótipo

A caracterização de espécies apomíticas como auto ou alopoliplóides é quase sempre realizada com base no pareamento cromossômico durante a meiose da microsporogênese. No caso das espécies pseudogâmicas apospóricas e diplospóricas, este procedimento provavelmente não envolve riscos maiores do que os que seriam encontrados na análise de espécies sexuadas pela mesma prática. Porém, a situação muda no caso das espécies diplospóricas autônomas, pois estas tendem a suprimir o pareamento cromossômico de homólogos. Nestes casos, estudos do ca-



riótipo são geralmente necessário. No entanto, tais estudos em plantas comprovadamente apomíticas são infrequentes.

Baseados em estudos do cariótipo, SORENSEN & GUDJONSSON (1946) concluíram serem as espécies *Taraxacum lacinositrans* e *T. polydon*, autotriplóides, ambas com $2n=3x=24$ e BERGMAN (1952) demonstrou ser *Chondrilla juncea* também um autotriplóide com $2n=3x=15$. Sem dúvida, uma das principais razões para a baixa frequência de estudos do cariótipo é o número cromossômico alto da maioria das plantas apomíticas (GRANT, 1975).

Os estudos do cariótipo de *Eupatorium squalidum* indicam a presença, no complemento, de três genomas morfologicamente semelhantes, assim caracterizando a espécie como autotriplóide (Tabelas 1 a 11, Figuras 42, 43, 44). A semelhança entre os três genomas é reforçada pela distribuição idêntica de heterocromatina centromérica e pela semelhança dos cromossomos SAT, (Figura 46), nunca mais do que três por célula. A presença desses três cromossomos coincide com a presença de 1 a 3 nucléolos por célula, observados durante o estudo da microsporogênese, que são invariavelmente associados com o total de 3 cromossomos SAT. Estas observações, mais a das associações dos 30 cromossomos do complemento em até 10 trivalentes durante a meiose, confirmam a determinação de ser *E. squalidum* um autotriplóide. Os estudos do cariótipo também concordam com os de meiose em não evidenciarem heteromorfismos estruturais.

O cariótipo de *E. squalidum* pode ser classificado como sendo homogêneo e simétrico (STEBBINS, 1971, GRANT, 1975), ou seja, a variação de tamanho entre os cromossomos é gradativa e com centrômero mediano ou sub mediano. Estas são características geralmente consideradas como típicas de cariótipos primitivos dentro de um grupo taxonômico (STEBBINS, 1971). Esta hi-



pótese porém, não pode ser testada no nosso estudo uma vez que não existem publicados estudos de cariótipos de outras espécies do gênero.

Em certos gêneros apomíticos como em *Taraxacum* e *Hieracium*, os níveis de poliploidia não passam de triplóide ou tetraplóide, enquanto em outros gêneros tais como: *Crepis*, *Potentilla*, *Poa* e *Alchemilla*, podem alcançar ou passar de decaplóide (GUSTAFSSON, 1947; NYGREN, 1954; ASKER, 1977, 1985). Todas as espécies de *Eupatorium* até agora estudadas em detalhe são triplóides, três delas, incluindo *E. squalidum* sendo $2n=3x=30$ e uma $2n=3x=51$. Investigações preliminares de outras espécies de *Eupatorium* encontradas na região de São José do Rio Preto já deram indícios de apomixia, sendo uma espécie triplóide, $2n=3x=30$ e três hexaplóides, $2n=6x=60$. Duas espécies, uma diplóide, $2n=2x=20$ e outra tetraplóide, $2n=4x=40$, parecem ser sexuadas. O quadro parcial que se apresenta até o momento, é de apomixia nas espécies poliplóides ímpares e de sexualidade nas espécies diplóides e poliplóides pares.

A determinação de $2n=30$ em seis plantas adultas e 115 plântulas de *E. squalidum* indica ser este o número característico da espécie, pelo menos nas populações estudadas. A única plântula determinada como sendo hexaplóide $2n=6x=60$, originou-se provavelmente da duplicação do número cromossômico em tecidos somáticos que deram origem ao megasporócito. Não se sabe se plantas hexaplóides conseguem se estabelecer em populações naturais de *E. squalidum*.

IV.4 - Germinação e Produção de Sementes; Observações de Campo.

A produção de aquênios em 56,1% das flores examinadas, com a germinabilidade de 21,8%, demonstra a capacidade de *E.*



squalidum se reproduzir à partir de sementes. A produção de aquênios por flores ensacadas e consequentemente impedidas de serem polinizadas, sustenta a conclusão dessa espécie ser apomítica, com desenvolvimento autônomo do endosperma. A produção reduzida de aquênios por parte das flores ensacadas intactas e a ausência de produção de aquênios por parte das flores ensacadas emasculadas são explicáveis com base na alteração do ambiente das flores em consequência do ensacamento e pelo prejuízo físico sofrido pelas flores emasculadas.

Até o presente não foi detectada nenhuma evidência de hibridização entre as espécies de *Eupatorium* da região de São José do Rio Preto, embora condições de proximidade e época de floração pudessem permitir. A falta de hibridização poderia ser, por um lado, devido a uma baixa afinidade genética entre as espécies, formando uma barreira e, por outro, em consequência dessas espécies serem apomíticas e com baixa fertilidade do pólen. As espécies neste caso formariam sistemas genéticos fechados. Evidentemente, as duas possibilidades não são mutuamente exclusivas. Não há porém nenhuma evidência do envolvimento de *E. squalidum* na formação de um complexo apomítico.



V - RESUMO E CONCLUSÕES

Este estudo teve por objetivo investigar o modo de re produção da espécie *Eupatorium squalidum* DC (COMPOSITAE) e foi constituído das seguintes abordagens:

- I - Desenvolvimento do gametófito feminino.
- II - Estudo da Microsporogênese.
- III - Estudo do Cariótipo.
- IV - Estudo da produção e germinabilidade das sementes.
- V - Observações de Campo.

Os estudos da megasporogênese e megagametofitogênese foram realizados utilizando-se o método de clarificação de óvulos. O material de estudo foi coletado de cinco plantas de populações naturais da região de São José do Rio Preto e fixado em F.A.A. e C.R.A.F.

Com base na falta de observação de núcleos mostrando o formato de halteres, típico de núcleos de restituição, ou de produtos degenerados de meiose, concluiu-se pela divisão mitótica na megasporogênese. A indicação é a da divisão do núcleo do megasporócito ser não redutiva através de mitose ou de formação de núcleos de restituição. O megasporócito funciona diretamente como megásporo e seu núcleo sofrendo três divisões sucessivas vai dar origem a um saco embrionário com 8 núcleos, do tipo Polygonum. Constatou-se que as antípodas formam três células e param seu desenvolvimento e as sinérgides logo se degeneram. O início de formação do embrião a partir da oosfera precede a do endosperma e os dois núcleos polares invariavelmente se fundem, formando o núcleo central que origina o endosperma.

A análise do conteúdo de 587 óvulos na fase de pré-ân

tese (botão fechado) revelou que 69,2% já continham embriões. A constatação de embrionia precoce representa uma evidência bastante forte de apomixia em *E. aqualidum*. Dois fatores indicam ser a diplosporia o tipo de apomixia envolvido; 1º) a divisão não redutiva do núcleo do megasporócito e 2º) a não observação de células apospóricas. Do total de 1377 óvulos examinados nas fases de pré-ântese, ântese e pós-ântese, nenhum revelou a presença de tubo polínico embora 52,4% (722) continham embrião e 28,5% (392) continham embrião e endosperma. Esta análise reforça a determinação de apomixia em *E. squalidum* e demonstra o desenvolvimento autônomo do endosperma.

Botões florais de seis plantas foram fixados em etanol absoluto e ácido acético (3:1) e a microsporogênese estudada pela técnica de esmagamento, usando carmin acético como corante. A análise do pareamento cromossômico durante diacinese revelou grande variabilidade entre microspocócitos de plantas individuais, bem como entre plantas diferentes. Em certas células, todos os 30 cromossomos ocorreram como univalentes, e em outras, todas associadas em dez trivalentes e ainda em outras, em números variáveis de univalentes, bivalentes e trivalentes. A configuração média de 398 células analisadas foi de 15,1 univalentes, 4,1 bivalentes e 2,2 trivalentes. Nas diferentes plantas estudadas, o número médio de univalentes por célula variou de 5,0 a 27,9, o de bivalentes de 0,9 a 6,6 e de trivalentes de 0,1 a 5,4.

Nas fases de meiose subsequentes à diacinese foram observadas várias anormalidades. Na metáfase, cromossomos não alinhados na placa, especialmente univalentes, foram frequentes. Durante a anáfase I foram observadas a disjunção precoce das cromátides, cromossomos retardatários, e a distribuição desigual dos cromossomos aos pólos. A segunda divisão também mos

trou a presença de cromossômos retardatários, bem como a formação de núcleos de diferentes tamanhos, indicando duplicações e deficiências de cromossômos.

A formação de núcleos de restituição foi observada, principalmente na primeira divisão, mas também na segunda. A frequência de meiose não redutiva variou nas plantas estudadas de 17,6 a 96,9%. Os grãos de pólen formados como produtos de meiose redutiva seriam caracterizados por um alto grau de esterilidade devido ao não balanceamento genético. Existe uma possibilidade de fertilidade dos grãos de pólen triplóides produzidos por meiose não redutiva, porém, esta possível fertilidade seria diminuída pela não inclusão de uma parte dos cromossômos no núcleo de restituição, fenômeno este observado com frequência.

Os estudos de cariótipo foram baseados na análise de seis células de pontas de raízes fixadas em etanol absoluto e ácido acético (3:1), pré-tratadas com oxiquinoleína (0,002M) e coradas com carmin acético. O tamanho médio dos cromossômos foi de aproximadamente 2 a 4 μ com cromossomo submetacêntricos.

Medidas do braço longo (L), do braço curto (C), do comprimento total (L+C) e da proporção dos braços (L/C) permitiram reconhecer três genômas idênticos no complemento, o que indica ser *E. squalidum* um autotriplóide $2n=3x=30$. Autotriploidia também é indicada pela presença de três cromossômos SAT morfológicamente semelhantes no complemento e pela distribuição idêntica de heterocromatina centromérica nos três genomas. A observação de até dez trivalentes em prófase de meiose da microsporogênese também colabora com a designação de *E. squalidum* como autotriplóide.

A capacidade de populações da espécie se manteram à



partir de sementes é indicada pela formação de aquênios em 56,1% (825) de 1471 flores marcadas e pela germinação de 21,1% (198) de 910 sementes postas para germinar em placas de Petri. A formação de sementes, mesmo por flores ensacadas, constitui outra evidência em favor da existência de apomixia com desenvolvimento autônomo do endosperma em *E. squalidum*, bem como a observação da ausência total de polinizadores trabalhando nas flores.

Embora a espécie estudada forme populações mixtas ou em grande proximidade com outras oito espécies do gênero na Região de São José do Rio Preto, com épocas de floração coincidentes com sete delas, não foi detectada nenhuma evidência que indique hibridização interespecífica, ou a existência de um possível complexo apomítico. Fatores que poderiam servir para impedir hibridização interespecífica são a embrionia precoce e a reduzida fertilidade masculina em *E. squalidum*, condições semelhantes possíveis entre outras espécies e diferenciação genética incluindo níveis de ploidia entre as espécies.

Observations failed to reveal the formation of megaspores or degenerated products of meiosis, which indicates the division of the megasporocyte nucleus to be non-reductive, either by being mitotic or by the formation of restitution nuclei. The megasporocyte functions directly as a megaspore, its nucleus undergoing three successive divisions to form an 8-nucleate embryo sac of the Polygonum type. It was observed that the antipodals cease development after forming three cells and the synergids soon degenerate. The initiation of embryo development precedes endosperm initiation. The two polar nuclei invariably fuse to form a central nucleus which initiates the endosperm.

An analysis of the contents of 537 ovules in the stage



VI - SUMMARY

This study had as its objective the investigation of the reproduction of *Eupatorium squalidum* (Compositae) and is composed of the following approaches:

- I - Field observations
- II - Studies of megasporogenesis and megagametophytogenesis
- III - Studies of microsporogenesis
- IV - Studies of seed production and germination
- V - Karyotypic studies

The studies of megasporogenesis and megagametophytogenesis were realized using the method of ovule clarification. The material studied was collected from five plants of natural populations occurring in the vicinity of São José do Rio Preto, S.P., Brazil. F.A.A. and C.R.A.F. were used as fixatives

Observations failed to reveal the formation of megaspores or degenerated products of meiosis, which indicates the division of the megasporocyte nucleus to be non-reductive, either by being mitotic or by the formation of restitution nuclei. The megasporocyte functions directly as a megaspore, its nucleus undergoing three successive divisions to form an 8-nucleate embryo sac of the Polygonum type. It was observed that the antipodals cease development after forming three cells and the synergids soon degenerate. The initiation of embryo development precedes endosperm initiation. The two polar nuclei invariably fuse to form a central nucleus which initiates the endosperm.

An analysis of the contents of 587 ovules in the stage



of pre-anthesis (bud closed) revealed that 69,16% already demonstrated embryo formation. The demonstration of precocious embryony is strong evidence for the existence of apomixis in *E. squalidum*. Two factors indicate diplospory to be the type of apomixis involved: the non reductive division of the megasporocyte nucleos and the failure to observe aposporic cells. Of a total of 1377 ovules examined in the stages of pre-anthesis and post-anteses, none revealed the presence of a pollen tube, although 52,43% (722) contained an embryo and 28,47% (392) contained an embryo and endosperm. This analysis substantiates the determination of apomixis in *E. squalidum* and demonstrate the development of the endosperm to be autonomous.

Buds from six plants were fixed in ethanol: acetic acid (3:1), and microsporogenesis studied by the smear technique using acetocarmine as the stain. The analysis of chromosome pairing during diakinesis revealed great variability between microsporocytes of individual plants, as well as between different plants. In some cells all 30 chromosomes occurred as univalents, in other cells all occurred as 10 trivalents and in still other cells varying numbers of univalents, bivalents and trivalents were observed. In the 398 cells analyzed, the mean pairing configuration was 15,08 univalents, 4,11 bivalents and 2,24 trivalents. In the different plants studied, the mean number of univalents per cell varied from 5,01 to 27,85, bivalents from 0,91 to 6,61 and trivalents from 0,12 to 5,41.

The meiotic phases subsequent to diakinesis revealed several abnormalities. As metaphase I unaligned chromosomes, especially univalents, were frequent. Abnormalities observed at anaphase I include precocious chromatid disjunction,



lagging chromosomes and unequal distribution of chromosomes to the poles. Second division also revealed the presence of lagging chromosomes, as well as different sized nuclei, indicating duplications and deficiencies of chromosomes.

The formation of restitution nuclei was also observed, principally at the first division, but also at the second. The frequency of non-reductive meiosis in the plants studied varied from 17,6% to 96,9%. Pollen grains formed by reductive meiosis undoubtedly are characterized by a high degree of sterility due to genetic unbalance. There exists the possibility of fertility on the part of the triploid pollen grains which result from non-reductive meiosis; however, the possibility of fertility would be reduced by the non-inclusion of some chromosomes in the restitution nucleus, a frequently observed phenomenon.

The karyotypic studies were based on the analysis of six root tip cells. Preparations were made by the smear technique, using ethanol: acetic acid (3:1) as fixative, 8 - hydroxyquinoline (0,002M) as pretreatment and acetocarmine as stain. All the 30 chromosomes of the complement are small, measuring approximately from 2 to 4 μ and have submetacentric centromeres. Measurements of total, short arm and long arm lengths and arm ratio, permit the recognition of three identical genomes in the complement, which indicates *E. squalidum* to be an autotriploid $2n=3x=30$. Autotriploidy is also indicated by the presence of three morphologically similar SAT chromosomes in the complement and by identical distribution of centromeric heterochromatin in the three genomes. The observation of up to ten trivalents in cells of meiotic prophase of microsporogenesis also corroborates the designation of *E. squalidum* as being an autotriploid.



The capacity of populations of *E. squalidum* to maintain themselves through seed is indicated by the formation of seeds in 56,1% (825) of 1471 marked flowers and by the germination of 21,8% (198) of 910 seeds sown in petri dishes. The formation of seeds by sacked flowers constitutes still another evidence in support of apomixis with autonomous development of endosperm in *E. squalidum*, as does also the observation that virtually no pollinators work the flowers.

Although *E. squalidum* forms mixed populations or occurs in great proximity with eight other species of the genus in the region of São José do Rio Preto, and has at least partially overlapping flowering periods with seven of these, no evidence was observed which would suggest interspecific hybridization or the existence of a possible apomictic complex. Factors which could serve to impede interspecific hybridization are the precocious embryony and reduced pollen fertility of *E. squalidum*, similar conditions in some of the other species and genetic differentiation, including ploidy level, between *E. squalidum* and the other species.



VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J. & BENKE, E.S. In: *Laboratory Manual for Introductory Mycology*. Minneapolis Burgess Publishing Co. 1952. 250 p.
- ALMGARD, G. Experiments with *Poa* III. *Am. Agric. Coll Sweden*, 32:3-64, 1966.
- ASHER, J.H. Parthenogenesis and genetic variability. II. One locus models for various diploid populations. *Genetics*, 66:369-391, 1970.
- ASKER, S. Pseudogamy, hybridization, and evolution in *Potentilla*, *Hereditas*, 87:179-184, 1977.
- ASKER, S. Progress in apomixis research. *Hereditas*, 91: 231-240, 1979.
- ASKER, S. Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation. *Hereditas*, 93:277-293, 1980.
- ASKER, S. Apomixis and Biosystematics. In: *Plant Biosystematics*. 1984, Canadá Academic Press. p. 237-248.
- ASKER, S. Polymorphisms of *Potentilla tabernaemontani* and related taxa on Gotland. *Hereditas*, 102:39-45, 1985.
- BAJER, A. & MOLE-BAJER, J. Spindle dynamics and chromosome movements. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 3:1-255, 1972.
- BAKER, J.G. Compositae. In Martius. *Flora Brasiliensis*, 6. 1884.
- BATTAGLIA, E. Ricerche cariologiche ed embriologiche sul genere *Rudbeckia*. VIII. Semigamia in *Rudbeckia lacinata*. *Nuovo G. Bot. Ital (NS)* 53:483-511, 1946.
- BEAMAN, J.H. The systematics and evolution of *Townsendia* (Compositae) *Contrib. Gray Herbarium (Harvard)* 133, 1957.
- BENTHAM, G. & HOOKER, J.D. *Genera Plantarum*, 2:141-186, 1876.

- BERGMAN, B. Studies on the embryo sac mother cell and its developments in *Hieracium* subg. *Archieracium*. *Svensk Bot Tidsskr*, 35:1-42, 1941.
- BERGMAN, B. On the formation of reduced and irreduced gametophytes in the female of *Antennaria carpatica*. *Hereditas*, 37:501-518, 1951.
- BERGMAN, B. Chromosome morphological studies in *Chondrilla juncea* and some remarks in the microsporogenesis, *Hereditas*, 38:128-130, 1952.
- BLAKESLEE, A.; BELLING, J.; FRANHAM, M. & BERGNER, A. A haploid mutant in the jimson weed, *Datura stramonium*. *Science*, 55:646-647, 1922.
- BROWN, W; EMERY, W. Apomixis in the *Gramineae*, tribe *Andropogoneae*: *Themeda triandra* and *Bothriochloa ischaemum*. *Bot. Gaz*, 118:246-253, 1957.
- BURTON, G. & FORBES, I. Jr. The genetic and manipulation of obligate apomixis in common bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge), *Int. Grassl. Congr. Proc.*, 8:66-71, 1960.
- CHAO, C.Y. Megasporogênese e megagametofitogênese in *Paspalum commersonii* and *P. longifolium* at two polyploid levels. *Bot. Not.*, 127:267-275, 1974.
- CHAO, C.Y. Autonomous development of embryo in *Paspalum conjugatum* Berg. *Bot. Not.*, 133:215-222, 1980.
- CHRISTOFF, M. Die genetische grundlage der apomiktischen fortpflanzung bei *Hieracium aurantiacum* L.Z. *Indukt Abstamm Vererbungslehre*, 80:103-125, 1942.
- CHRISTOFF, M. & PAPASOVA, G. Die genetischen guindlagen der apomiktischen Fortpflanzung in der Gattung *Potentilla*. *Z. indukt Abstamm Vererbungslehre*, 81:1-27, 1943.
- CHRISTOFF, M. Über die Fortpflanzun-gsverhältnisse bei



- einigen Arten der Gattung *Hieracium* nach einer experimentell induzierten chromosomenvermehrung. *Planta*, 31:73-90, 1940.
- CLAUSEN, R.E. & LAMMERTS, W.E. Interespecific hybridization in *Nicotiana* X Haploid and diploid merogamy. In: MASHEWARI, P. ed. *An introduction to the Embryology of Angiosperms*. New York, 1950. McGraw-Hill Book Co. Inc. p. 35-41.
- CLAUSEN, J. Partial apomixis as an equilibrium system in evolution. *Cariologia Suppl.*, 6:469-479, 1954.
- COE, G.E. Cytology of reproduction in *Cooperia pedunculata*. *Am. J. Bot.*, 40:335-343, 1953.
- COLEMAN, J.R. Chromosome numbers in some Brazilian Compositae. *Rhodora*, 70:228-240, 1968.
- COLEMAN, J.R. Additional chromosome numbers in Brazilian Compositae. *Rhodora*, 72:94-99, 1970.
- COLEMAN, J.R. & COLEMAN, M.A. Apomixis in two triploid Brazilian species of *Eupatorium*: *E. bupleurifolium* and *E. callilepsis*. *Rev. Bras. Genet.*, 7:549-567, 1984.
- CLEU, G.; BOCK, T. DE & LEKKERKERKER, B. Crosses between *Beta vulgaris* L. and *Beta lomatogona* F. et M. *Euphytica*, 25:539-547, 1976.
- CONNOR, H.E. Breeding systems in grasses: A survey *N.Z.J. Bot.*, 17:547-574, 1979.
- COOPER, D.C. Haploid-diploid twin embryos in *Lilium* and *Nicotiana*. *Amer. Jour. Bot.*, 30:408-413, 1943.
- CRÉTÉ, P. Un cas de polyembryonie chez une Gentianacee, 1'*Erythraea centaurium*. *Pers. Bull. Soc. Bot. de France*, 96:113-115, 1949.
- DARLINGTON, C.D. *Recent advances in cytology*. 2^a ed. Blakiston, Philadelphia, 1937, 671 p.

- DARLINGTON, C.D. & WYLIE, A.P. *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. Great Britain, The University Press, 2^a ed., 1955, 519 p.
- DARLINGTON, C.D. *The evolution of genetic systems*. Basic Books, Inc. Publ. 1958, 265 p.
- DAVIS, G.L. *Systematic Embryology of the Angiosperms*. 1^a ed. New York, John Wiley & Sons, Inc. 1966. 528 p.
- DAVIS, G.L. Apomixis in the Compositae. *Phytomorphology*. 17:270-277, 1967.
- DE CANDOLLE, A.P. & DE CANDOLE, A. ed. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. 5:141-186, 1836.
- DE WET, J.M. & HARLAN, J.R. Apomixis, polyploidy and speciation in *Dicanthium*. *Evol.*, 24:270-277, 1970.
- DE WET, J.M.J. & STALKER, H.T. Gametophytic Apomixis and Evolution in Plants. *Taxon*, 23:689-697, 1974.
- D'CRUZ, R. & REDDY, P.S. Inheritance of apomixis in *Dichanthium*. *Indian J. Genetic Plant Breed*, 31:451-460, 1971.
- DYER, A. Investigating chromosomes. LONDON, Edward Arnold Publ. Ltd. 1979. 138 p.
- ERNST, A. Bastardierung al Ursache der Apogamie in Pflanzenreich. Jena, G. Fisher. 1918. In: STEBBINS, L. ed. *Variation and Evolution in Plants*. New York Columbia University Press, 1949. p. 390-396.
- ESAU, K. Morphology of reproduction in guayule and certain other species of *Parthenium*. *Hilgardia*, 17:61-101, 1946.
- FARQUHARSON, L. Apomixis and polyembryony in *Tripsacum dactyloides*. *Am. J. Bot.*, 42:737-743, 1955.
- FAGERLIND, F. Die Terminologie der Apomixis Prozesse. *Hereditas*, 26:1-22, 1940.
- FAGERLIND, F. Die samenbildung und die Zytologie bei agamospermischen and sexuellen Arten von *Elastotema* und



- einigen nahestehenden Gattungen nebst Belenchtung einiger damit zusammen hängender Probleme. *K. Sven Vetenskapsakad Handl*, 21(4):1-130, 1944.
- FAGERLIND, F. Macrogametophyte formation in two agamospermous *Erigeron* species. *Acta Horti Bergiani*, 14:221-247, 1947.
- FRYXELL, P.A. Mode of reproduction in higher plants. *Bot. Rev.*, 23:135-233, 1957.
- FÜRNKRANZ, D. Citogenetische Untersuchungen and *Taraxacum* in Raume von Wien II. Hybriden zwischen *T. officinale* *T. palustre*. *Österr Bot. Z*, 108:408-415, 1961.
- GAIRDNER, A.E. & C.D. Darlington. Ring formation in diploid and polyploid *Campanula persifolia*. *Genetica*, 13:113-150, 1931.
- GOULD, E.W. & KAPADIA, Z.J. Biosystematic studies in the *Boutelona curtispindula* complex. I - The aneuploid rhizomatous *B. curtispindula* of Texas. *Amer. Jour. Bot.*, 49:887-892, 1962.
- GOULD, E.W. & KAPADIA, Z.J. Biosystematic studies in the *Boutelona curtispindula* complex II. Taxonomy. *Brittonia*, 16:182-207, 1964.
- GRANT, W.F. A cytotaxonomic study in the genus *Eupatorium*. *Am. Jour. of Bot.*, 40:729-42, 1953.
- GRANT, W. A cytotaxonomic study in the genus *Eupatorium*. *Am. Jour. Bot.*, 40:729-42, 1953.
- GRANT, V. *Genetics of Flowering Plants*. New York, Columbia University Press. 1975. 514 p.
- GAIRDNER, A. & DARLINGTON, C. Ring formation in diploid and polyploid *Campanula persifolia*. *Genética*, 13:113-150, 1931.



- GUSTAFSSON, A. Studies on the mechanism of parthenogenesis. *Hereditas*, 20:1-31, 1935.
- GUSTAFSSON, A. Apomixis in higher plants. I - *The mechanism of apomixis*. II The causal aspects of apomixis. III. Biotype and species formation. *Lund Univ. Arsskrift N.F.* 1946-1947. 370 p.
- HAFLIGER, E. Zytologisch - embryologische Untersuchungen pseudogamer Ramunkien der Auricomis - Gruppe. Ber. Schweiz. Bot. Ges., 53:317-382, 1943.
- HAGERUP, O. On fertilization, polyploidy, and haploidy in *Epispactis latifolia*. K. Danske Vidensk. Selsk., Biol. Meddel., 19(11):1-13, 1944.
- HAGERUP, O. Facultative partenogenesis and haploidy in *Epipactis latifolia*. K. Danske Vidensk. Selsk., Biol. Meddel., 20(9):1-22, 1945.
- HAIR, J.B. Subsexual reproduction in *Agropyron*. *Heredity*, 10:129-160, 1956.
- HÄKANSSON, A. Die Entwicklung des Embryosacks und die Befruchtung bei *Poa alpina*. *Hereditas*, 29:25-61, 1943.
- HÄKANSSON, A. & ELLERSTROM, L. Seed development after reciprocal crosses between diploid and tetraploid rye. *Hereditas*, 36:256-296, 1950.
- HÄKANSSON, A. Studien über die Entwicklungsgeschichte der Umbelliferen. Lunds Univ. Arsskr. N. F. Avd., 2:1-120, 1956.
- HANNA, W.; POWELL, J.; MILLOT, J. & BURTON, G. Cytology of obligate sexual plants in *Panicum maximum* Jacq. and their use in controlled hybrids. *Crop. Sci.*, 13:695-697, 1973.
- HARLAN, J.R.; BROOKS, M.A.; BORGAONKAR, D.S. & DE WET, J.M. Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and

- Dichanthium*. *Bot. Gaz.*, 125:41-46, 1964.
- HARLAN, J.R. & DE WET, J.M. On $\bar{O}$ Winge and A Prayer: The origins of polyploidy. *The Botanical Review*, 41:361-390, 1975.
- HERR, J.M. Jr. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *Am. J. Bot.*, 58:785-790, 1971.
- HERR, J.M. Jr. Applications of a new clearing technique for the investigation of vascular plant morphology. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 88:137-143, 1972.
- HESLOP-HARRISON, J. Apomixis, environment and adaptation. In: *Recent Advances in Botany*. Proc. 9th Int. Bot. Cong. University of Toronto Press. vol. I. ano 1961. p. 891-895.
- HOLMGREN, I. Zytologische studien über die Fortpflanzung bei den Gattungen *Erigeron* and *Eupatorium*. In: GUSTAFSSON, A. ed. *Apomixis in higher plants*. I. The mechanism of apomixis. II. The causal aspects of apomixis. III. Biotype and species formation. Lund Univ. Arsskrift N.F. 42:1-68; 43:69-180; 43:181-370. 1946-1947.
- HOWARD, H.W. The size of seeds in diploid and autotetraploid *Brassica oleraceae* L. *Jour. Genetics*, 38:325-340, 1939.
- HOWARD, H.W. The effect of polyploidy and hybridity on seed size in crosses between *Brassica chinensis*, *B. carinata*, amphidiploid *B. chinensis-carinata* and autotetraploid *B. chinensis*. *Journ. Genetics*, 43:105-119, 1942.
- HOWARD, H.W. Seed size in crosses between diploid and autotetraploid *Nathartium officinale* and allotetraploid *N. uniseriatum*. *Jour. Genetics*, 48:111-118, 1947.
- ISMAILOW, R. Observations in embryo and endosperm development in various chromossomic types of the apomitic species



- Ranunculus cassubicus* L. *Acta Biol. Cracov Ser. Bot.*, 10:183-195, 1967.
- ISMAILOW, R. Cytogenetic studies in the apomitic species *Ranunculus cassubis* L. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.*, 13:37-50, 1970.
- ISMAILOW, R. Problem of apomixis in *Ranunculus auricomus* group *Acta Biol. Cracov Ser. Bot.*, 19:15-20, 1976.
- ISLAM, A.K. & SHEPHERD, K.W. Meiotic restitution in wheat-barley hybrids. *Chromosoma*, 79:363-372, 1980.
- JOHANSEN, A. *Plant Microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Co, Inc. 1940. 523 p.
- JORGENSEN, C.A. The experimental formation of heteroploid plants in the genus *Solanum*. *Journ. Genet.*, 19:133-211, 1928.
- JUEL, O. Parthenogenesis bei *Antennaria alpina* (L.) Br. In: Gustafsson, A. ed. *Apomixis in higher plants*. I - The mechanism of apomixis. II - The causal aspects of apomixis. III - Biotype and species formation. Lund Univ. Arsskrift N.F. 1946-1947. p. 111-137.
- KING, R.M. & ROBINSON, H. *Eupatorium*, a Compositae genus of Arcto-tertiary distribution. *Taxon*, 19:769-774, 1970.
- KNOX, R.B. & HESLOP-HARRISON, J. Experimental control of aposporous apomixis in grass of the *Andropogoneae*. *Bot. Notiser.*, 116:127-141, 1963.
- KNOX, R.B. Apomixis: Seasonal and population differences in a grass. *Science*, 57:325-326, 1967.
- KOSTOFF, D. An androgenic *Nicotiana* haploid. In: MASHEWARI, ed. *An introduction to the Embryology of Angiosperms*. New York, Mc Graw-Hill Book. Co. 1950, p. 317-323.
- LA COUR, L. Improvements in plant cytological technique. *Bot. Rev.*, 5:241-258, 1937.
- LAIBACH, F. Das Tanbwerden von Bastardsamen und die Künstliche. 1925. In: STEBBINS. *Variation and Evolution in Plants*. New York. Columbia University Press. 3^a ed. 1957. p. 215.
- LEBÈQUE, A. Embryologie des Saxifragacées. Polyembryonic chez le *Bergenia delawayi* Engl. *Bull. Soc. Bot. de France*, 96:38-39, 1949.
- LILJEFORS, A. Cytological studies in *Sorbus*. *Acta Hort.*, 17:47-113, 1955.
- LORENZI, H. ed. *Plantas Daninhas do Brasil*. H. Lorenzi ed. Nova Odessa, SP. 1982. p. 74.

- MAHESHWARI, P. *An introduction to the embriology of angiosperms*. New York. McGraw-Hill. 1950.
- MALECKA, J. Cyto-taxonomical and embryological investigations on a natural hybrid between *Taraxacum kok - saghyz* Rodin and *T. officinale* Web. and their putative parent species. *Acta Biol. Croc. Ser. Bot.*, 14:179-197, 1971.
- MALECKA, J. Problems of the mode of reproduction in microspecies of *Taraxacum* section *Palustria* Dahlstedt. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.*, 16:37-84, 1973.
- MARSHALL, D.R. & BROWN, A.H.D. The Evolution of Apomix. *Heredity*, 47(1):1-15, 1981.
- MARKLUND, G. & ROUSI. Outlines of evolution in the pseudogamous *Ranunculus auricomus* group in Finland. *Evolution*, 15:510-522, 1961.
- MATZK, F. Vorstellungen über potentielle Wege sur Apomixis bei Getreide. *Arch Züchtungsforsch*, 12:183-195, 1982.
- MOSKOVA, R.D. & YAKOVLEV Apomixis of *Bothriochloa ischaemum* L. Flowering, pollination, fertilization. In: Linskens, H.F. (ed) *Fertilization in higher plants*. Amsterdam. North - Holland Publ. p. 341-349. 1974.
- MUNTZING, A. Apomictic and sexual seed formation in *Poa*. *Hereditas*, 17:131-154, 1933.
- MURBECK, S.V. "Über Anomalien in Baue des Nucellus und des Embryosackes bei parthenogenetischen Arten der Gattung *Alchemilla*. 1902 s In: ed. GUSTAFSSON, A. ed. Apomixis in higher plants. I. The mechanism of apomixis. II. The causal aspects of apomixis. III. Biotype and species formation. Lund Univ. Arsskrift N.F. 1946-47. II. p. 1-10.
- MYERS, W.M. Analysis of variance and covariance of chromosomal association and behavior during meiosis of



- clones of *Dactylis glomerata*. *Bot. Gaz.*, 104:541-552, 1943.
- MYERS, W.M. & HILL, H.D. Variations in chromosomal association and behavior during meiosis among plants from open-pollinated populations of *Dactylis glomerata*. *Bot. Gaz.*, 104:171-177, 1942.
- NOGLER, G.A. Genetik der Aposporie bei *Ranunculus auricomus* s.l.W. Koch. I. Embryologie. *Ber Schweiz. Bot. Ges.*, 81: 139-179, 1971.
- NOGLER, G.A. Genetik der Aposporie bei *Ranunculus auricomus*. II. Endospermizytologie - *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, 82:54-63, 1972.
- NOGLER, G.A. Genetik der Aposporie bei *Ranunculus auricomus*. III. F_2 - Rück Kreuzungsbastarde. *Ber Schweiz Bot. Ges.*, 83:295-305, 1973.
- NOGLER, G.A. Genetics of apospory in *Ranunculus auricomus*. IV. Embryology of F_3 and F_4 backcross offspring. *Phytomorphology*, 25:485-490, 1975.
- NOGLER, G.A. Zur Zytogenetik der Apomixie bei *Ranunculus auricomus* - *Habilitationsschrift ETH Zurich*, 916:704-218 H, 1978.
- NOGLER, G.A. *Gametophytic apomixis*. In JOHRI, B. ed. *Embryology of Angiosperms*. Berlin-Heidelberger, Springer-Verlag, 1984. p. 475-515.
- NYGREN, A. The genesis of some Scandinavian species of *Calamagrostis*. *Hereditas*, 32:131-262, 1946.
- NYGREN, A. Cytological and embryological studies in arctic Poae. *Symb. Bot. Ups.*, 10:1-64, 1950.
- NYGREN, A. Form and biotype formation in *Calamagrostis purpurea*. *Hereditas*, 48:508-519, 1951.

- ORNDUFF, R. Pathways and patterns of evolution - a discussion. *Taxon*, 19:202-204, 1970.
- OSAWA, J. Studies on the cytology of some species of *Taraxacum*. *Arch Zeleforsch.*, 10:450-469, 1913.
- OKABE, S. Parthenogenesis bei *Ixeris dentata*. *Bot. Mag* (Tokyo), 46:518-523, 1932.
- PODDUBNAJA-ARNOLDI, W.A. Geschlechtliche und ungeschlechtliche. Fortpflanzung bei cinegen chondrilla-Arten. *Planta*, 19:46-86, 1933.
- POWERS, L. Fertilization without reduction in guayule (*Parthenium argentatum* Gray) and a hypothesis as to the evolution of apomixis and polyploidy. *Genetics*, 30:323-346, 1945.
- RENNER, O. Zur terminologie des pflanzlichen generationswechsels. *Biol. Zbl.* 36:337-1916. In: eds. RIEGER, R.; MICHAELIS, A.; GREEN, M. Berlin Heidelberg New York. 1976, 647 p.
- REUSCH, J.D.H. The relationship between reproductive factors and seed set in *Paspalum dilatatum* S. Afr. *J. Agric. Sci.*, 4:513-530, 1961.
- RHOADES, M.M. Genetic control of chromosome behavior. Maize. *Genetics Coop. Newsletter*, 30:38-42, 1956.
- ROBINSON, H. & KING, R.M. Phytogeographical patterns in the tribe Eupatoriae (Asteraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 19:45-52, 1980.
- RUTISHAUSER, A. Pseudogamie und Polymorphie in der Gattung *Potentilla*. *Arch Julius Klaus - Stift Vererbungsforsch*, 23:267-424, 1948.
- RUTISHAUSER, A. Die Enwicklungserregung der Elizelle bei pseudogamen Arten der Gattung *Ranunculus*. *Bull. Schweiz.*



- Akad. Med. Wiss.*, 10:491-512, 1954.
- SARAN, S. & DE WET, J.M. The mode of reproduction in *Dichanthium intermedium* (Gramineae). *Bull. Torrey Bot. Club.*, 97:6-13, 1970.
- SARAN, S. & DE WET, J.M. Environmental control of reproduction in *Dichanthium intermedium*. *J. Cytol Genet.*, 11:22-28, 1976.
- SAVIDAN, Y. Héredité de l'apomixie. Contribution à l'étude de l'héredité de l'apomixie sur *Panicum maximum* Jacq. (analyse des sacs embryonnaires). *Cah ORSTOM Sér. Biol.*, 10:91-95, 1975.
- SAVIDAN, Y. L'apomixie gametophytique chez les graminées et son utilisation en Amélioration des Plantes. *Ann Amélior Plant* (Paris), 28:1-9, 1978.
- SAVIDAN, Y. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of Guinea Grass (*Panicum maximum* Jacq.). *Proc. XIV Intl. Grassland Conger Lexington Ky*, 182-194, 1980.
- SAVIDAN, Y. Nature et héredité de l'apomixie chez *Panicum maximum*. *Trau Doc ORSTOM*, 153:1-159, 1982.
- SAVIDAN, Y. Evolução em Gramíneas tropicais com especial referência a Apomixia. Tópicos de citogenética e evolução de plantas. *I Colóquio sobre Citogenética e Evolução de Plantas*. Piracicaba, 1984.
- SKIEBE, K. Genetische Voraussetzungen für die samenbildung. 1973. In: ASKER, S. *Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation*. *Hereditas*, 93:277-293, 1980.
- SMITH, G.L. Studies in *Potentilla* L. I. Embryological investigations into the mechanism of agamospermy in British *P. tabernaemontani* Aschers. *New Phytol.*, 62:264-282, 1963.

- SNYDER, L.A.; HERNANDEZ, A.R.; WARMKE, H.E. The mechanism of apomixis in *Pennisetum ciliare*. *Bot. Gaz.*, 116:209-221, 1955.
- SNYDER, L.A. Apomixis in *Paspalum secans*. *Am. J. Bot.*, 44: 318-324, 1957.
- SORENSEN, T. & GUDJONSSON. Spontaneous chromosome aberrants in apomictic *Taraxaca*. *Kangel. Danske Vidensk. Selsk., Biol. Skr.*, 4:1-48, 1946.
- SPARVOLI, E. Osservazioni cito-embriologiche in *Eupatorium riparium* Reg. II. Megasporogenesi e sviluppo del gameto. fito femminile. *Ann di Bot. (Rome)*, 26:48-504, 1960.
- SPARROW, A.H.; RUTTLE, M.L. & NEBEL. Comparative cytology of sterile intra and fertile intervarietal hybrids of *Antirrhinum majus* L. *Amer. J. Bot.*, 29:711-715, 1942.
- STEBBINS, G.L. Cytology of *Antennaria*. I. Normal species. *Bot. Gaz.*, 94:134-51, 1932.
- STEBBINS, G.L. A new species of *Antennaria* from the Appalachian region. *Rhodora*, 37:229-37, 1935.
- STEBBINS, G.L. & JENKINS, J.A. Aposporic development in the North American species of *Crepis*. *Genetics*, 21:191-224, 1939.
- STEBBINS, G.L. *Variation and evolution in plants*. New York Univ. Press, 1950. 643 p.
- STEBBINS, G.L. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. ONTARIO, ADDISON - WESLEY PUBL. CO. 1971. 215 p.
- SKALINSKA, M. Embryological studies in *Poa granitica* Br. B1. an apomictic species of the Carpathian range. *Acta Biol. Cracou Ser. Bot.*, 2:91-112, 1959.
- SKALINSKA, M. Further studies in facultative apomixis of *Hieracium aurantiacum* L. *Acta Biol Cracou Ser. Bot.*, 16:



121-133, 1973.

SKIEBE, K. Genetische Voraussetzungen für die Samenbildung nach intergenomatisch verschiedenen Kreuzungen. *Arch. Züchtungsf.*, 3:183-202, 1973.

SKALINSKA, M. Cytological diversity in the progeny of octoploid facultative apomicts of *Hieracium aurantiacum*, *Acta Biol. Cracov Ser. Bot.*, 19:39-46, 1973.

TALIAFERRO, C.M. & BASHAW, E.C. Inheritance and control of obligate apomixis in breeding buffelgrass, *Pennisetum ciliare* - *Crop. Sci.*, 6:473-476, 1966.

TINNEY, F.W. Cytology of parthenogenesis in *Poa pratensis*. *J. Agric. Res. (Washington)*, 60:351-360, 1940.

TURNER, B.L. & IRWIN, H.S. Chromosome numbers in the Compositae II. Meiotic counts for fourteen species of Brazilian Compositae. *Rhodora*, 62:122-126, 1960.

WAGENAAR, E.B. Cytological studies of the development of metaphase I in hybrids between *Triticum timopheevi* and *T. durum*. *Canad. J. Bot.*, 39:81-108, 1961a.

WAGENAAR, E.B. Cytological studies of development of metaphase I in *Triticum* hybrids. II The behaviour of univalents in meiotic cell division. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 3:204-225, 1961b.

WAGENAAR, E.B. Meiotic restitution and the origin of polyploidy. I. Influence of genotype on polyploid seed set in *Triticum crassum* X *T. turgidum* hybrid. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 10:836-843, 1968a.

WAGENAAR, E.B. Meiotic restitution and the origin of polyploidy. II Prolonged duration of metaphases I as causal factor restitution induction. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 10:844-852, 1968b.



WARMKE, G. Apomixis and sexuality in *Hierochloa australis* and in Swedish *H. odorata* on different polyploid levels.

Bot. Not., 120:209-235, 1954.

WATKINS, A.E. Hybrid sterility and incompatibility. *Jour.*

Genet., 30:257-266, 1932.

WINKLER, H. Uber Parthenogenesis and apogamie in

Pflanzenreich. *Prog. Rei. Bot.*, 2:293-454, 1908.

CRAF

Sol. A. Ácido crômico 1 g

Ácido acético glacial 7 cc

Água destilada 92 cc

Sol. B. Formalina 33 cc

Água destilada 65 cc

F.A.A.

500 ml álcool etílico (95%)

50 ml ácido acético

115 ml formaldeído (35%)

335 ml água destilada

Uso: F.A.A. e CRAF usados na fixação de óvulos para o estudo da megasporogênese.

HERR (solução 4 1/2 por peso)

Fenol 1

Cloral hidratado 1

Óleo de cravo 1

Ácido láctico 1

Xilol 1/2

Uso: clarificação de óvulos inteiros

MEIO DE HOYER

50 ml água destilada

30 g goma arábica

200 g cloral hidratado

16 ml glicerina

Uso: para montagem de óvulos clarificados e para fazer preparações permanentes de cromossomos meióticos e mitóticos.

APÊNDICE

PREPARO DOS REAGENTES E DAS DROGAS USADAS NAS TÉCNICAS DESCRITAS

CARNOY

3 partes de álcool etílico absoluto

1 parte de ácido acético glacial

Uso: na fixação de anteras para o estudo de microsporogênese e pontas de raízes para estudo do cariótipo.

CRAF

Sol. A. Ácido crômico 1 g

Ácido acético glacial 7 cc

Água destilada 92 cc

Sol. B. Formalina 35 cc

Água destilada 65 cc

F.A.A.

500 ml álcool etílico (95%)

50 ml ácido acético

115 ml formaldeído (35%)

335 ml água destilada

Uso: F.A.A. e CRAF usados na fixação de óvulos para o estudo da megasporogênese.

HERR (solução 4 1/2 por peso)

Fenol 1

Cloral hidratado 1

Óleo de cravo 1

Ácido lático 1

Xilol 1/2

Uso: clarificação de óvulos inteiros

MEIO DE HOYER

50 ml água destilada

30 g goma arábica

200 g cloral hidratado

16 ml glicerina

Uso: para montagem de óvulos clarificados e para fazer preparações permanentes de cromossomos meióticos e mitóticos.



AGRADECIMENTOS

O surgir deste mestrado, teve antes de tudo a idéia e o incentivo dos amigos, professores e pioneiros da implantação do curso de pós-graduação em Ciências Biológicas de São José do Rio Preto, Professores Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo e Dr. Celso Abbade Mourão aos quais dedico grande admiração e respeito. À eles, o meu especial agradecimento.

Ao prof. Dr. James Robert Coleman, pela sugestão, orientação e assistência durante a elaboração da tese.

Ao prof. Dr. Gerhard Bandel, pela valiosa colaboração na revisão e sugestões do texto.

Ao prof. Dr. Celso Abbade Mourão, pela criteriosa leitura e revisão do texto e orientação estatística.

À profa. Dra. Marileila Varella Garcia, coordenadora do curso de pós-graduação, pela palavra amiga nas horas certas.

Aos professores do curso de pós-graduação, pela nossa retomada do entusiasmo de continuar aprendendo.

Aos colegas do curso, pelo convívio jovial e amigo que nos proporcionou uma forma de renovar.

A chefia do Departamento de Botânica na pessoa da Profa. Dra. Eurides Mambreu de Menezes, pela colaboração na disposição dos serviços datilográficos em tempo hábil.

Aos Departamentos de Biologia e de Zoologia, através das respectivas chefias, Prof. Dr. Aluísio José Galo e Prof. Dr. Waldir Antonio Taddei, pela cooperação cordial no empréstimo da máquina de escrever, sem a qual não teria sido possível a execução datilográfica do texto.

Aos colegas docentes do Departamento de Botânica, pelo incentivo e cordialidade.

À srta. Maria Helena Carabolante, sempre eficiente e prestativa na assistência de laboratório e na confecção das reproduções fotográficas.

Ao Sr. Ademir de Oliveira Veschi e a Sra. Wanda Maria Barbosa Brandão, pela solícita e competente execução datilográfica.

À Sra. Vilma Therezinha de Souza Strengari, secretária do Departamento de Botânica, pelo atendimento capaz das questões burocráticas.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, pela disponibilidade das condições materiais para a execução deste trabalho.

A todos os amigos e funcionários do IBILCE que de uma forma ou de outra contribuíram para o bom desempenho dos trabalhos.

