

Maristela Sanches Bertasso Borges

Citogenética e Embriologia de *Eupatorium*
Intermedium DC e *E. Pauciflorum*
HBK (Compositae)



1910000723



MARISTELA SANCHES BERTASSO BORGES

CITOGENÉTICA E EMBRIOLOGIA DE *EUPATORIUM INTERMEDIUM* DC
E *E. PAUCIFLORUM* HBK (Compositae).

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Genética, no curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, UNESP.



723/96

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

1993



Orientador: Prof. Dr. James Robert Coleman



Este trabalho foi realizado nos Departamentos de Biologia e Botânica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista - UNESP, com o auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICADO A MEUS PAIS

Alcides e Odete

que tanto fazem por mim

AGRADECIMENTOS

"Bem aventurados os humildes de espírito porque
deles é o Reino dos céus."

Mt 5,3

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, venho agradecer às pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que ele pudesse realizar-se.

Ao Prof. Dr. James Robert Coleman, pela orientação, incentivo e dedicação com que cuidou deste trabalho, pela forma singela com que me tratou durante estes cinco anos em que me orienta, sempre tão compreensivo e amigo, o meu respeito, admiração e agradecimento.

À Prof. Dra. Catalina R. Lopes e Prof. Dra. Neuza T. Ranga, pela forma com que cuidaram da análise da dissertação, revisando-a e aperfeiçoando-a, meus agradecimentos.

À Prof. Dra. Marina T. A. Coleman, pelo incentivo e amizade e por ter aceitado, quando eu estava no primeiro ano de graduação, orientar-me no meu primeiro estágio, passando-me, com tanta capacidade, o gosto pela aprendizagem científica, meu agradecimento e admiração.

À Prof. Dra. Mary M. Itoyama, pela amizade e companheirismo e por tudo o que fez por mim enquanto estive no IBILCE, um carinho muito especial.

Aos amigos da pós-graduação, pelo convívio fraterno e pelas palavras certas nas horas certas, em especial à Sheila A. Vayego, com quem troquei muitas idéias durante todo o tempo.

À Prof. Dra. Marileila V. Garcia, coordenadora da pós-graduação, pelo auxílio em todos os momentos necessários.

À chefia do Departamento de Botânica, na pessoa do Prof. Dr. Orlando Necchi Jr., pela colaboração na disposição das dependências do departamento onde a maior parte do trabalho foi realizada.

À Sra. Vilma T. S. Strengari e ao Sr. Ademir O. Veschi, pela amizade e paciência que tiveram quando me ensinaram a utilizar o computador, sem o que, o término deste trabalho teria sido muito mais difícil.

À Sra. Maria Helena C. de Sá, sempre amiga e tão eficiente e prestativa, pela valiosa colaboração durante a



confeccção das fotografias. INDICE

I. INTRODUÇÃO Aos funcionários da Biblioteca que com tanta capacidade atendem aos nossos pedidos. 01

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação que estão sempre atentos às questões burocráticas. 06

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos. 09

Aos meus pais, Alcides e Odete, que desde o princípio me encorajaram para que essa dissertação pudesse se concretizar, meu amor e respeito. 14

Ao Carlos, meu marido e melhor amigo, que me apóia e me dá forças nas horas em que preciso, pela compreensão nas muitas horas que não pude estar a seu lado, ocupada com as tarefas da pós, meu amor e meu carinho. 20

À Deus, que nos deu o dom da vida, nos presenteou com a liberdade, nos abençoou com a inteligência, nos deu a graça de lutarmos para a conquista das nossas realizações. A Ele cabe o louvor e a glória. A nós só cabe agradecer. 27

1.1. OBJETIVO GERAL 34

1.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 34

2. REVISÃO DE LITERATURA 37

2.1. A BIBLIOTECA 37

2.2. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.3. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.4. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.5. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.6. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.7. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.8. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.9. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.10. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.11. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.12. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.13. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.14. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.15. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.16. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.17. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.18. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.19. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.20. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.21. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.22. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.23. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.24. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.25. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.26. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.27. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.28. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.29. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.30. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.31. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.32. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.33. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.34. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.35. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.36. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.37. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.38. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.39. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.40. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.41. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.42. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.43. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.44. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.45. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.46. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.47. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.48. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.49. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.50. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.51. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.52. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.53. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.54. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.55. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.56. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.57. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.58. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.59. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.60. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.61. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.62. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.63. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.64. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.65. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.66. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.67. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.68. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.69. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.70. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.71. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.72. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.73. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.74. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.75. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.76. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.77. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.78. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.79. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.80. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.81. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.82. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.83. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.84. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.85. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.86. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.87. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.88. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.89. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.90. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.91. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.92. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.93. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.94. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.95. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.96. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.97. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.98. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.99. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.100. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.101. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.102. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.103. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.104. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.105. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.106. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.107. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.108. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.109. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.110. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.111. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.112. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.113. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.114. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.115. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.116. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.117. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.118. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.119. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.120. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.121. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.122. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.123. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.124. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.125. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.126. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.127. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.128. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.129. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.130. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.131. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.132. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.133. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.134. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.135. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.136. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.137. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.138. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.139. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.140. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.141. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.142. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.143. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.144. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.145. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.146. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.147. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.148. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.149. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.150. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.151. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.152. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.153. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.154. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.155. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.156. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.157. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.158. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.159. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.160. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.161. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.162. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.163. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.164. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.165. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.166. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.167. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.168. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.169. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.170. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.171. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.172. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.173. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.174. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.175. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.176. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.177. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.178. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.179. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.180. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.181. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.182. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.183. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.184. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.185. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.186. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.187. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.188. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.189. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.190. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.191. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.192. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.193. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.194. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.195. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.196. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.197. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.198. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.199. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.200. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.201. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.202. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.203. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.204. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.205. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.206. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.207. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.208. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.209. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.210. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.211. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.212. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.213. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.214. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.215. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.216. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.217. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.218. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.219. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.220. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.221. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.222. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.223. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.224. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.225. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.226. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.227. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.228. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.229. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.230. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.231. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.232. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.233. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.234. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.235. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.236. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.237. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.238. A BIBLIOTECA DA UNESP 37

2.239. A

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	Página
1. O fenômeno apomítico	01
2. Formação do embrião e endosperma nas espécies apomíticas	06
3. A meiose nas espécies apomíticas	09
4. Regulação genética da apomixia	11
5. Influência da poliploidia e hibridização sobre apomixia	14
6. Significado evolutivo da apomixia.....	17
7. Apomixia e melhoramento vegetal	18
8. A família Compositae e o gênero <i>Eupatorium</i> : caracterização geral	19
9. Objetivos	22
II. MATERIAL E MÉTODOS	23
III. RESULTADOS	27
1. <i>Eupatorium intermedium</i>	
1.1 Embriologia.....	27
1.2 Microsporogênese	34
1.3 Cariótipo	37
1.4 Ocorrência de polinização	47
1.5 Germinabilidade e produção de sementes	47
2. <i>Eupatorium pauciflorum</i>	
2.1 Embriologia	51
2.2 Microsporogênese	56
2.3 Cariótipo	56
2.4 Ocorrência de polinização	61
2.5 Germinabilidade e produção de sementes	61
IV. DISCUSSÃO	66
V. RESUMO	73
VI. SUMMARY	76
VII. BIBLIOGRAFIA	79
VIII. APÊNDICE	91

I. INTRODUÇÃO

1. O fenômeno apomítico:

Nas Angiospermas a reprodução sexuada ocorre através da união dos gametas feminino (oosfera) e masculino (núcleo reprodutivo) ambos reduzidos cromossomicamente durante a meiose. Nas plantas sexuadas a oosfera é produzida em um saco-embrionário, formado a partir da divisão meiótica da célula-mãe-de-megásporos, contida no óvulo. Portanto, meiose e fertilização são processos envolvidos no desenvolvimento do embrião em plantas sexuadas. A meiose precede a formação dos gametas e a fertilização restaura o número cromossômico somático. Desta forma, nas plantas sexuadas, um núcleo reprodutivo masculino une-se à oosfera para formar o zigoto que dará origem ao embrião, enquanto um segundo núcleo reprodutivo masculino une-se ao núcleo central e, então, a célula triplóide resultante dará origem ao endosperma.

Segundo WILLESENSE & NAUMOVA (1992) em espécies sexuadas, durante o desenvolvimento do gametófito feminino podemos notar cinco estágios distintos: planejamento, transição, seleção, maturação e fertilização. No estágio de planejamento, uma célula da nucela é selecionada para tornar-se a célula arquesporial, caracterizando-se pelo aumento do conteúdo citoplasmático. No estágio seguinte, transição, ocorre meiose e, assim, a transição do nível diplóide para haplóide. Durante esta fase podemos notar uma polaridade celular com uma distribuição de organelas celulares como plastídeos, mitocôndrias e vesículas. Esta polarização levará à seleção do megásporo funcional (WILLESENSE, 1981). Durante este estágio, ainda ocorre a formação da parede de calose que, de alguma forma isola o megasporócito do tecido nucelar.

O estágio seguinte (seleção) leva à formação do megásporo funcional, através de divisões meióticas. O citoplasma do megásporo apresenta um alto número de ribossomos e armazena produtos como amido, lipídeos e proteína. No estágio de maturação ocorre a diferenciação das duas sinérgides, oosfera e três



antípodas. O megásporo aumenta de tamanho através de vacuolização e, comumente, vesículas celulares são formadas e fundidas, formando um grande vacúolo. A formação da parede celular precede a diferenciação celular e a forma do aparelho da oosfera torna-se estabilizada pelo citoesqueleto. Na célula central, os dois núcleos fundem-se antes da fertilização e atuam como célula inicial para o desenvolvimento do endosperma. No último estágio de formação do gametófito feminino, o estágio de fertilização, ocorre a fusão dos gametas. Com a formação do zigoto, o ciclo de vida do megagametófito é finalizado e o novo esporófito tem início.

Em certos grupos de Angiospermas a reprodução sexuada é regularmente combinada ou substituída por um processo de reprodução assexuada denominado apomixia. Originalmente WINKLER (1908) definiu apomixia de forma geral incluindo os vários tipos de reprodução vegetativa por meio de bulbos, bulbilhos, estolões e rizomas. Segundo ASKER (1979), essencialmente mais importantes são os casos nos quais as sementes são formadas sem fertilização prévia da oosfera. Nesta situação já utilizava-se o termo agamospermia (GUSTAFSSON, 1946; GRANT, 1971; STEBBINS, 1941).

De acordo com SOLNZEVA (1990) inicialmente, o termo apomixia era entendido como o modo de reprodução em que não ocorria fusão de núcleos reprodutivos, incluindo o fenômeno de formação de sementes sem fertilização e reprodução vegetativa. Depois, o termo agamospermia foi instituído para designar a reprodução por sementes sem que ocorra fertilização e, assim, apomixia passou a ser dividida em agamospermia e reprodução vegetativa. Gradualmente, a noção de apomixia passou a excluir reprodução vegetativa e, atualmente, somente o fenômeno de agamospermia é entendido como apomixia.

A apomixia é um tipo de reprodução assexuada que utiliza a mesma via de dispersão da reprodução sexuada, ou seja, a semente. Atualmente, os termos apomixia e agamospermia são considerados equivalentes (ASKER, 1984), conceito este, que está sendo seguido neste trabalho.

Na reprodução apomítica, o embrião é derivado de divisões mitóticas ou de meiose modificada de uma célula-mãe-de-megásporos ou de uma célula somática do óvulo. Meiose e fertilização não estão envolvidas no desenvolvimento do embrião e, assim, a progênie de plantas apomíticas são réplicas exatas da planta-mãe (HANNA & BASHAW, 1987).

NOGLER (1984a) afirmou que o fenômeno apomítico cobre, fundamentalmente, dois modos de reprodução: a embrionia adventícia e a apomixia gametofítica.

Na embrionia adventícia, o novo embrião, isto é, o novo esporófito, origina-se, diretamente, de uma célula somática do óvulo e, portanto, o estágio gametofítico é eliminado, sendo que somente o endosperma é produzido no saco-embriônico (GUSTAFSSON, 1939; JOHANSEN, 1950; DAVIS, 1967).

Segundo WAKANA & UEMOTO (1987), em *Citrus* e em muitos outros gêneros que apresentaram embrionia adventícia, polinização e fertilização são pré-requisitos para iniciação de embriões adventícios. Tipicamente, polinização é seguida pela dupla fertilização de um saco-embriônico sexual, reduzido, e tanto o embrião quanto o endosperma iniciam seu desenvolvimento. O estímulo do desenvolvimento do embrião sexuado resulta no crescimento de embriões apomíticos na nucela e, deste modo, a semente madura pode conter além do embrião sexuado, um, dois, ou raramente mais, embriões apomíticos. A produção de dois ou mais embriões num mesmo óvulo é denominada poliembrionia (WEBBER, 1940). A embrionia adventícia é um fenômeno bem distribuído entre as Angiospermas, especialmente nas famílias Rutaceae e Liliaceae, tendo sido observado em mais de 250 espécies de angiospermas (NAUMOVA, 1990).

Na apomixia gametofítica, o saco-embriônico, ou seja, o gametófito feminino surge diretamente da célula-mãe-de-megásporos sendo, portanto, não-reduzido. Uma distinção é, geralmente, feita entre: a) diplosporia, na qual o saco-embriônico origina-se da célula-mãe-de-megásporos, diretamente através de mitose ou indiretamente através de meiose modificada, resultando num núcleo de restituição e b) aposporia, na qual o



saco-embriónico origina-se de células somáticas do óvulo, usualmente da nucela.

NOGLER (1984a) reconheceu três tipos de diplosporia: *Antennaria*, *Taraxacum* e *Ixeris*.

O tipo *Antennaria* é o mais frequente modo de desenvolvimento de sacos-embriónicos não-reduzidos a partir da célula-mãe-de-megásporos e foi descrito, primeiramente, em *Antennaria alpina*, na qual esta célula não entra em meiose mas, após um longo período de intérfase, cresce e sofre vacuolização agindo, então, como um megásporo não-reduzido. Duas mitoses posteriores levam à formação do saco embriónico 8-nucleado, maduro. Este tipo de diplosporia é amplamente distribuído entre espécies do gênero *Antennaria* (DAVIS, 1967; STEBBINS, 1932), *Eupatorium* (HOLMGREN, 1919; SPARVOLI, 1960; COLEMAN & COLEMAN, 1984), *Hieracium* (GUSTAFSSON, 1935), *Poa* (GUSTAFSSON, 1939), *Calamagrostis* (NYGREN, 1949), *Parthenium* (ESAU, 1946) *Elastotema* (FAGERLIND, 1944), entre outras.

O tipo *Taraxacum*, descoberto no gênero, caracteriza-se pelo fato de que a célula-mãe-de-megásporos entra em prófase meiótica, mas devido à assinapse os univalentes permanecem espalhados sobre a placa metafásica não ocorrendo migração aos pólos. A primeira divisão meiótica resulta na formação de um núcleo de restituição que engloba todo o complemento cromossômico somático e a segunda divisão meiótica resulta em uma díade, não-reduzida. Usualmente, a célula da díade da região chalazal sofre três mitoses levando à formação do saco-embriónico 8-nucleado. Representantes importantes do tipo *Taraxacum* estão entre as *Compositae*: *Taraxacum* (GUSTAFSSON, 1939; JOHANSEN, 1950; DAVIS, 1967); *Erigeron* (HOLMGREN, 1919), entre outros.

Como em *Taraxacum*, no tipo *Ixeris* uma divisão meiótica assindética leva à formação do núcleo de restituição que sofre uma divisão correspondente à segunda divisão meiótica, porém, o citoplasma da célula não se divide e o saco-embriónico resultante contém dois núcleos. Posteriormente, duas divisões mitóticas resultarão no saco-embriónico 8-nucleado. O tipo *Ixeris* é encontrado em espécies do gênero *Ixeris* (OKABE, 1932) e



em alguns representantes da família Compositae, como *Rudbeckia* (NYGREN, 1954) e *Erigeron* (GUSTAFSSON, 1935).

GUSTAFSSON (1947) sugeriu que os tipos de diplosporia podem ser condicionados por fatores ambientais, como por exemplo, condições de cultivo. SPARVOLI (1960) mostrou que, em *Eupatorium riparium*, há uma mudança do "tipo mitótico" (*Antennaria*) para o "tipo meiótico" (*Taraxacum*). Os resultados sugerem que não há diferenças fundamentais entre estes tipos de diplosporia.

A aposporia é a formação do saco-embriológico a partir de células somáticas do óvulo, em geral, da nucela. O megasporócito sofre meiose e pode formar megásporos. Porém, uma célula somática invade o lóbulo nucelar, esmagando os megásporos. Uma vez ocupado o lóbulo nucelar, a célula apospórica sofre três divisões formando o saco-embriológico maduro. A célula apospórica inicial é, primariamente, reconhecida pelo crescimento e aumento de seu núcleo, especialmente do nucléolo, e por ser altamente vacuolizada (NOGLER, 1984a).

Aposporia é encontrada em espécies dos gêneros: *Hieracium* (GUSTAFSSON, 1946); *Crepis* (STEBBINS & BABCOCK, 1939); *Dichanthium* (REDDY & D'CRUZ, 1969; SARAN & DE WET, 1970), *Eupatorium* (COLEMAN & COLEMAN, 1984); *Poa* (AKEBERG, 1939), entre outras espécies.

Uma forma peculiar de aposporia ocorre na família Gramineae na qual durante o desenvolvimento do saco-embriológico não ocorre a terceira divisão mitótica e, assim, o saco-embriológico maduro contém quatro núcleos (duas sinérgides, oosfera e um núcleo polar) ao invés dos oito núcleos característicos. Deste modo, os sacos-embriológicos apospóricos distinguem-se dos sexuais por sua estrutura. Segundo SAVIDAN (1984), o aumento de tamanho e a diferenciação das células apospóricas, nas gramíneas tropicais, inicia-se, geralmente, antes do início da meiose.

RICHARDS (1986) afirma que agamospermia está presente em cerca de 15% das famílias de Angiospermas mas que, 75% destes táxons pertencem a somente 3 famílias: Compositae, Gramineae e Rosaceae. Portanto, é possível supor que as espécies destas



famílias são, de alguma forma, "pré-adaptadas" à agamospermia, mostrando altos níveis de poliploidia e hibridização. Podemos ainda, observando a distribuição de agamospermia entre as famílias notar uma "pré-adaptação" das Compositae à diplosporia enquanto Gramineae e Rosaceae, à aposporia.

Agamospermia pode ser obrigatória ou facultativa, dependendo da produção de sementes, se inteiramente por via assexuada ou em parte sexuada. A frequência com que embriões sexuais são observados em apomíticos facultativos é altamente variável e pode ser influenciada pelo ambiente (HUSSEY et al., 1971). Fotoperiodismo é um fator ambiental que parece ser bastante correlacionado com a frequência de sacos-embrionários apomíticos e sexuados. Em *Dichanthium aristatum* e *Themeda australis* há uma marcante associação entre o comprimento do dia durante o desenvolvimento da inflorescência e o grau de apomixia tal que dias curtos são associados a alta frequência de sacos-embrionários apomíticos (KNOX & HESLOP-HARRISON, 1963; KNOX, 1967; EVANS & KNOX, 1969).

Apomixia gametofítica sempre implica em duas modificações principais quando comparada à reprodução sexuada normal: a formação de sacos-embrionários não-reduzidos e a capacidade da oosfera de se desenvolver partenogeneticamente (MAHESHWARI, 1950).

2. Formação do embrião e endosperma nas espécies apomíticas:

A iniciação do embrião e endosperma nas espécies apomíticas pode ser completamente independente do processo de polinização, resultando em desenvolvimento autônomo do embrião e endosperma (apomixia autônoma), ou polinização pode ser necessária para a fecundação dos núcleos polares, levando ao desenvolvimento pseudogâmico do endosperma, sendo que, neste caso, somente a oosfera é capaz de desenvolvimento partenogenético (apomixia pseudogâmica).

Nas espécies pseudogâmicas o início de desenvolvimento do endosperma requer fertilização dos núcleos polares, o que foi confirmado através de análises citológicas de metáfases de



endosperma (HAKANSSON, 1943; RUTISHAUSER, 1954), bem como por observação direta da fertilização (COE, 1953; MOSKOVA & YAKOULEV, 1974; CHAD, 1980).

Nas plantas pseudogâmicas a oosfera inicia a divisão partenogeneticamente, entretanto, se não houver a formação do endosperma o pró-embrião aborta. KAPIL & BHATNAGER (1983) acreditam que enzimas da célula central são responsáveis pelo início da hidrólise da nucela e integumentos que servirão para nutrir o embrião em crescimento. Embriões de Gramineae desenvolvem-se somente em associação com a formação do endosperma. Nesta família, aborto de pró-embrião em cruzamentos inter-específicos é explicado como sendo causado por distúrbios no desenvolvimento do endosperma. De acordo com os resultados de MATZK (1991), o desenvolvimento do endosperma exerceria efeitos regulatórios na nutrição do pró-embrião.

Segundo CZAPIK (1991) em algumas espécies apomíticas, a formação do endosperma parece ser independente da embriogênese e pode começar antes, durante ou depois da divisão da oosfera. NOGLER (1984a) afirmou que "o estudo do endosperma é, ainda, um dos aspectos menos conhecidos da embriologia de apomíticos gametofíticos" e essa é uma das razões pelas quais os sistemas de classificação de apomixia não consideram o endosperma como um fator de classificação, havendo apenas a distinção entre divisão pseudogâmica e autônoma.

COOPER & BRINK (1949) afirmaram que a presença do endosperma é importante para o desenvolvimento da semente, pois realiza duas funções básicas: a) provavelmente elabora e certamente acumula nutrientes que serão, posteriormente, absorvidos pelo embrião; b) exerce uma ação reguladora nas porções maternas da semente, particularmente, durante os estágios iniciais de pós-fertilização. Segundo SCHEL et al. (1984), além destas, o endosperma agiria também na manutenção de um ambiente osmoticamente favorável ao desenvolvimento do embrião.

Análises citológicas do endosperma em apomíticos autônomos mostram que o grau de poliploidia é variável devido à variabilidade no número e extensão de fusão dos núcleos polares.



STEBBINS & JENKINS (1939) observaram, em *Crepis*, endosperma $2n$ e $4n$ surgindo de núcleos polares livres ou fundidos, o que significa que fusão de núcleos polares não é um pré-requisito para atividade mitótica do endosperma. A variação nos níveis de ploidia pode ocorrer em consequência da fusão ou não dos núcleos polares e do número de núcleos masculinos que atuam na fecundação (RUTISHAUSER, 1954; NOGLER, 1972).

GUSTAFSSON (1946) reconheceu três estágios que conduzem à plena assexualidade do endosperma nas espécies com desenvolvimento autônomo. No estágio primário, os núcleos polares se fundem antes da iniciação do endosperma. Este estágio é apresentado por *Eupatorium squalidum* (COLEMAN & COLEMAN, 1984), *Chondrilla* (PODDUNA-JA-ARNOLDI, 1933), *Taraxacum* e *Elastotema* (FAGERLIND, 1944), entre outras.

No segundo estágio, os núcleos polares às vezes se fundem e às vezes não, podendo, assim, produzir endosperma $2n$ ou $4n$. Esta condição é encontrada 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 callilepis* (COLEMAN & COLEMAN, 1984).

Geralmente, todas as espécies apomíticas do mesmo gênero apresentam o mesmo tipo de desenvolvimento do endosperma, autônomo ou pseudogâmico. Apomíticos pseudogâmicos, que dependem do pólen para a fertilização do núcleo central, em geral, apresentam microsporogênese e formação de grãos-de-pólen normal. Quando as plantas pseudogâmicas apresentam esterilidade masculina a produção de sementes é dependente da polinização por formas não-apomíticas vizinhas (SMITH, 1963; NYGREN, 1950).

Em muitas espécies pseudogâmicas o embrião inicia o seu desenvolvimento, na maioria dos óvulos, somente após a iniciação do endosperma, como o que ocorre em *Hypericum perforatum* (NOACK, 1939), *Ranunculus auricomus* (RUTISHAUSER, 1954), *R. cassubicus* (IZMAILOV, 1967) e muitos apospóricos da família Gramineae, tribo Panicoideae, como *Panicum maximum* (WARMKE, 1954), *Pennisetum*



ciliare (SNYDER et al. 1955) e *P. dubium* (GILDENHUYS & BRIX, 1959).

Outras espécies pseudogâmicas, ainda na fase de botão, antes da antese, apresentam desenvolvimento precoce do embrião (embrionia precoce), e assim, a formação do embrião precede o desenvolvimento do endosperma que ocorre somente após fertilização do núcleo central. Exemplos deste fato são *Poa* (AKEBERG, 1942) e *Parthenium* (ESAU, 1946) entre outros. Certos gêneros apresentam uma condição transitória contendo espécies com ambos os tipos, por exemplo, *Potentilla* (RUTISHAUSER, 1948; SMITH, 1943) e *Paspalum* (SNYDER, 1957; REUSCH, 1961). Em apomíticos autônomos ambos os tipos são conhecidos, porém embrionia precoce prevalece, como em *Hieracium* (SKALINSKA, 1973) e *Taraxacum* (MALECKA, 1971), sendo que, neste caso, o endosperma pode iniciar seu desenvolvimento antes da antese. A importância da embrionia precoce é a de prevenir reprodução sexuada, pois a divisão da oosfera antes da antese torna a fertilização impossível.

3. A meiose nas espécies apomíticas:

Meiose é um processo complexo controlado por centenas de genes, sendo que, a maioria dos fatores que afetam a meiose nos organismos diplóides também influenciam os processos meióticos nos poliplóides. Nas plantas superiores há genes que afetam a habilidade dos cromossomos para pareamento e a localização e número de quiasmas. Outros, são expressos durante a gametogênese e alguns podem limitar seus efeitos à microsporogênese ou à megasporogênese (JACKSON, 1976).

As irregularidades durante a meiose nas plantas apomíticas oferecem material favorável para se estudar o mecanismo de meiose em geral, sendo que, anormalidades encontradas nas anteras não são correlacionadas com aquelas presentes nos óvulos. Isto se confirma pelo estudo citológico de um grande número de apomíticos, demonstrando-se que alguns apresentam microsporogênese normal, outros, algum tipo de anormalidade ou até ausência de meiose masculina, não existindo



nenhuma relação se apomixia, nestes grupos, é facultativa ou obrigatória, ou do tipo de anormalidade que caracteriza o ciclo apomítico (STEBBINS, 1941). No entanto, as espécies pseudogâmicas não apresentam muitas anormalidades meióticas, já que a produção de sementes depende da produção de pólen viável capaz de fertilizar o núcleo central e dar início à formação do endosperma.

SULLIVAN (1976), trabalhando com espécies norte-americanas de *Eupatorium*, afirmou que todas as plantas determinadas como sendo diplóides produziram pólen normal, de tamanho e forma uniformes. Em contraste, a maioria das plantas triplóides e tetraplóides não produziram grãos-de-pólen ou os produziram mal-formados. LASER & LERSTEN (1972) sugeriram que o fracasso na produção de pólen, em poliplóides, é devido à aborto de células mãe-de-micrósporos como resultado de uma má função do tapetum.

NYBOM (1988) sugeriu uma conexão entre o grau de distúrbios meióticos por um lado e a produção de sacos-embrionários não-reduzidos, fertilidade do pólen e conjunto de sementes, por outro. No gênero *Rubus*, vários distúrbios meióticos, comumente encontrados nas espécies apomíticas, diminuem a fertilidade do pólen e, deste modo, a formação de sementes, já que pólen é necessário para o desenvolvimento do endosperma, nesta espécie.

De acordo com GENTSCHEFF & GUSTAFSSON (1940) os distúrbios fisiológicos envolvidos durante a meiose são usualmente distintos nos óvulos e anteras da mesma espécie. As irregularidades mais frequentes na meiose podem estar relacionadas ao comportamento e distribuição dos cromossomos como: ausência de pareamento e contração cromossômica e retardamento ou precocidade das divisões meióticas.

Segundo STEBBINS (1950) as anormalidades mais marcantes, tanto de micro como de megasporogênese, são encontradas naquelas plantas que combinam diplosporia com desenvolvimento autônomo do endosperma.

Nas espécies apospóricas, meiose é um processo independente do desenvolvimento de sacos-embriônários. Em princípio, os dois processos podem ocorrer simultaneamente no mesmo óvulo mas, usualmente, a célula-mãe-de-megásporos ou o produto de sua divisão meiótica são eliminados, de forma que, somente o saco-embriônário apospórico persiste. O tempo de indução da aposporia é decisivo. CHRISTOFF & PAPASOVA (1943) demonstraram que, em *Potentilla*, quando a indução da aposporia é suficientemente precoce, os sacos-embriônários são totalmente apospóricos, enquanto que, a indução tardia leva à produção de sacos-embriônários meióticos.

4. Regulação genética da apomixia:

Para entendermos a regulação genética do fenômeno apomítico devemos considerar que há dois componentes principais na apomixia: a produção de oosferas meioticamente não-reduzidas e o desenvolvimento partenogenético destas oosferas. Além disso, há variação nas vias pela qual apomíticos "evitam" meiose reducional e uma associação positiva entre apomixia e poliploidia. Todos esses fatores são controlados por genes apomíticos que se localizam em vários locos e cuja expressão resulta de uma resposta de dosagem que é mais facilmente conseguida através da poliploidização (MOGIE, 1988).

Segundo ASKER (1979) diferentes genes, ou grupos de genes, são responsáveis pelas duas modificações do ciclo sexual para se obter um ciclo apomítico. A análise do "background" genético de espécies apomíticas, é feita utilizando-se como recurso usual cruzamentos entre linhagens apomíticas e sexuais relacionadas, e o estudo do modo de reprodução dos descendentes (ASKER, 1980).

Alguns modelos para a regulação genética da apomixia gametofítica têm sido propostos. POWERS (1945) descreveu um modelo de regulação para diplosporia pseudogâmica em *Parthenium argentatum*, assumindo que homozigiosidade para certos genes recessivos é um pré-requisito para reprodução apomítica que seria então, controlada por três genes: um controlando a produção de



oosferas não-reduzidas (alelos Aa), outro impedindo a fertilização de oosferas (alelos Bb) e um terceiro, controlando o desenvolvimento partenogenético da oosfera (alelos Cc). Assim, apomíticos apresentariam o genótipo aabbcc.

De acordo com LILJEFORS (1955) a espécie apomítica autotetraplóide *Sorbus aria* carrega no seu genoma A genes para apomixia, enquanto em *S. aucuparia* (diplóide), o genoma B carrega os genes correspondentes para sexualidade. Os cruzamentos entre as duas espécies resultaram em triplóides e tetraplóides com a seguinte constituição genômica: AAAA, AAAB e AAB sendo obrigatoriamente apomíticos; ABB, apomítico ou sexuado enquanto BB é totalmente sexuado. De acordo com este sistema, apomixia e sexualidade são dependentes do balanço entre os genes que controlam as duas características. O controle da apomixia em *Paspalum notatum*, segundo BURTON & FORBES (1960), após o estudo de cruzamentos entre tetraplóides sexuais e apomíticos, se dá através de poucos genes recessivos.

TALIAFERRO & BASHAW (1966) estudaram a herança da apomixia em *Pennisetum ciliare*. Cruzamentos entre plantas sexuadas e apomíticas obrigatórias, desta espécie, resultaram na produção de 5 sexuadas para 3 apomíticas. O modo de reprodução, proposto por estes autores, é controlado por um sistema de 2 genes onde B condiciona sexualidade e é epistático sobre A, que controla apomixia. Assim, os genótipos de plantas apomíticas e sexuadas seriam A₁bb e A₁B₁, respectivamente.

No complexo *Ranunculus auricomus*, NOGLER (1975, 1982, 1984b, 1986), analisou a herança da aposporia através de cruzamentos entre a espécie sexuada diplóide *R. cassubicifolius* e a espécie tetraplóide *R. megacarpus*, concluindo que, a indução de sacos-embrionários apospóricos é feita através de um único fator apospórico dominante (A⁻), sendo que o alelo selvagem A⁺ não contribui para aposporia. Assim, espécies apomíticas são heterozigotas A⁻/A⁺ enquanto espécies sexuadas são homozigotas A⁺/A⁺. O fator apospórico dominante A⁻ é letal quando em homozigose.



De acordo com NOGLER (1989), a presença do fator apospórico A- determina, qualitativamente, se o saco-embrionário será apospórico ou não. O grau de aposporia, ou seja, a porcentagem de óvulos com sacos-embrionários apospóricos, é determinada não somente pela dosagem do gene A- mas também pelo tempo de indução de sacos-embrionários apospóricos em relação ao desenvolvimento meiótico, sendo que, este tempo é um efeito puramente quantitativo não dependendo diretamente do gene A- e sua dosagem.

Estudos em várias espécies indicam uma base genética para aposporia semelhante ao que ocorre em *R. auricomus*. Isto é verdadeiro para *Poa* (ASKER, 1979), *Beta* (JASSEM, 1990), complexo *Bothriochloa-Dichanthium* (D'CRUZ & REDDY, 1971; HARLAN et al. 1964) e *Panicum maximum* (SAVIDAN, 1978, 1981).

Em *P. maximum*, todas as segregações observadas por SAVIDAN são condizentes com um modelo genético simples para herança de aposporia. Assim, diplóides sexuais teriam o genótipo aa enquanto o alelo A, condiciona apomixia. Deste modo, apomixia em *P. maximum* seria dominante sobre sexualidade.

ASKER (1980) afirma que o fenômeno apomítico está também sob controle ambiental, sendo influenciado por fatores como regime de luz e temperatura como o que foi demonstrado por SARAN & DE WET (1976) estudando *Bothriochloa intermedia*. Essa espécie se reproduz sexuadamente durante o verão e facultativamente apomítica durante o inverno. KNOX (1967) e KNOX & HESLOP-HARRISON (1963) encontraram diferenças significativas na formação de sacos-embrionários sexuados e apomíticos, relacionado ao regime de luz e diferenças com relação à altitude na espécie tetraplóide *Dichanthium aristatum*, tal que, altitudes elevadas e dias curtos são associados a uma alta incidência de sacos embrionários apospóricos. BURTON (1982) estudando o efeito do ambiente sobre apomixia, em *Paspalum notatum*, encontrou que variações no comprimento do dia de 10 para 16 horas fez com que um certo clone apomítico (T4), se reproduzisse sexuadamente.

Evidências sugerem que a formação ou não de uma parede de calose ao redor da célula-mãe-de-megásporos é fundamental na



determinação de sexualidade ou apomixia. CRANE & CARMAN (1987) e CARMAN et al. (1991) realizaram um estudo histológico comparativo da parede celular durante a megasporogênese em duas espécies de *Elymus*: *E. rectisetus* (apomítica) e *E. scabrus* (sexuada). Suas observações confirmam estes resultados demonstrando a presença de uma substancial parede de calose ao redor das células-mãe-de-megásporos na espécie sexuada *E. scabrus* e a ausência de tal parede na espécie apomítica *E. rectisetus*.

De acordo com RODKIEWICZ (1970) calose nas espécies sexuadas, é depositada ao redor da parede da células-mãe-de-megásporos durante a prófase I, em angiospermas que formam gametófitos femininos monospóricos e bispóricos. Segundo este autor, essa deposição continua durante toda megasporogênese e agiria como um filtro molecular permitindo a passagem de nutrientes, porém, excluindo macromoléculas, podendo isolar células mãe-de-megásporos de hormônios ou outros componentes da nucela ou do tapetum que possam difundir-se e interromper a meiose. Segundo DUMAS & KNOX (1983), calose é uma parede celular polissacarídica composta, geralmente, por 1,3 β glucana.

SAVIDAN (1991) afirmou que o gene *A-* afeta primeiramente a síntese de calose ao redor da célula-mãe-de-megásporos, e assim, o primeiro efeito deste gene seria a interrupção da síntese de calose.

5. Influência da poliploidia e hibridização sobre apomixia:

Apomixia está intimamente associada a certos estilos de vida e condições genéticas nas angiospermas. Segundo RICHARDS (1986), podemos assumir que atributos como hibridização e poliploidia predisõem algumas plantas ao estabelecimento da apomixia.

ERNST (1948) sugeriu uma íntima associação entre apomixia e hibridização, já que logo foi comprovado o fato de que a maioria das plantas apomíticas são altamente heterozigotas. Segundo STEBBINS (1950) hibridização promove apomixia à medida que a combinação de genes necessária para iniciar um ciclo apomítico é feita, mais facilmente, pela hibridização entre

espécies ou entre diferentes formas da mesma espécie.

Muitos complexos agâmicos são de origem híbrida. Entretanto, a hibridização entre apomíticos, quando possível, algumas vezes leva ao rompimento da apomixia. ASKER (1970a) demonstra que cruzamentos entre biótipos apomíticos de *Potentilla argentea* podem originar híbridos sexuais enquanto o híbrido interespecífico *P. argentea* X *P. canescens* é obrigatoriamente apomítico (ASKER, 1970b).

Segundo BASHAW & HIGHT (1990) a maioria dos apomíticos naturais são poliplóides, altamente heterozigotos e, geralmente, de origem híbrida. PAMILO (1987) afirmou que a ausência de recombinação em organismos apomíticos previne rearranjos gênicos e faz com que a heterozigosidade no nível do indivíduo aumente. Assim sendo, novas mutações se acumulam no genoma, gerando variabilidade que pode ser importante na evolução de organismos apomíticos, nos quais a flexibilidade dada pela recombinação é ausente. Assim, apomíticos, presumivelmente, mantem a altamente heterozigose devido à infrequência de recombinação e sua frequente origem através de hibridização (CAMPBELL & DICKINSON, 1990).

CLAUSEN (1961) afirmou que, no gênero *Poa*, os processos sexuado e apomítico ocorrem simultaneamente e que, a retenção do processo sexuado tem significado evolutivo pois permite hibridização que pode levar, em poucas gerações, a um bom número de biótipos apomíticos que podem propagar-se como semente.

Estudos eletroforéticos recentes de alguns grupos de plantas sexuadas e apomíticas revelaram que táxons apomíticos têm heterozigosidade superior a de seus parentes sexuados (BAYER & CRAWFORD, 1986; BAYER, 1989). Entretanto, YAHARA et al. (1991) revelaram que, em *Eupatorium altissimum*, não há diferença substancial em heterozigosidade entre plantas apomíticas e sexuadas.

Apomixia gametofítica está intimamente associada à poliploidia, sendo que todos os apomíticos gametofíticos são poliplóides. Assim, poliploidia favorece a ocorrência, estabelecimento e posterior sucesso de espécies apomíticas



(LUMARET, 1988). YUDIN et al. (1991) afirmaram que um aumento no nível de ploidia favorece a transição para apomixia em plantas, exemplificando que, em milho, há um aumento na frequência de partenogênese em consequência de autotetraploidização induzida através do tratamento com colchicina. DE WET (1971) afirmou que a poliploidia é rara em algumas famílias e comum em outras sendo que alguns gêneros são caracterizados pela ausência completa de poliploidia enquanto em outros, é extremamente comum.

QUARIN & HANNA (1980) demonstraram que, em *Paspalum hexastachyum*, as espécies diplóides são sexuadas e auto-estéreis enquanto as tetraplóides são auto-compatíveis e se reproduzem por apomixia facultativa. Segundo eles, o aumento nos níveis de poliploidia aparentemente leva à interrupção do sistema de auto-incompatibilidade e do mecanismo de reprodução sexuada. Neste gênero, espécies apomíticas diplóides não existem, mas aproximadamente 60% das espécies tetraplóides observadas são apomíticas, enquanto as restantes, sexuadas. Segundo BIERZYCHUDEK (1985), apomíticos gametofíticos são, na maioria das vezes, poliplóides, enquanto seus parentes sexuados, diplóides, o que é explicado através da origem híbrida da maioria dos apomíticos.

GUSTAFSSON (1947) afirmou que, embora apomixia possa ser encontrada em diplóides por mutações gênicas, a ação de muitos desses genes indutores de apomixia é mais evidente no nível poliplóide. No complexo *Bothriochloa-Dichanthium* (DE WET, 1968; DE WET & HARLAN 1970) e em *Panicum maximum* (SAVIDAN, 1978; SAVIDAN & PERNES, 1982) um ciclo diplóide-tetraplóide-dihaplóide foi descrito. Nas populações destas espécies as plantas tetraplóides apomíticas predominam sobre as diplóides sexuadas. Através da fusão de gametas não-reduzidos, estes diplóides dão origem a plantas autotetraplóides apomíticas. Neste nível ocorre troca de genes entre as plantas sexuadas e apomíticas. Nas espécies autotetraplóides ocorre a produção de gametas reduzidos ($2n$), alguns dos quais originam novas plantas diplóides (dihaplóides) através de partenogênese (partenogênese haplóide).

Um ciclo diplóide-tetraplóide-diplóide também foi descrito em *Potentilla argentea* por ASKER (1971, 1977). Nesta



espécie, as plantas diplóides são apomíticas facultativas e as autotetraplóides, sexuadas, sendo originadas através da fertilização entre gametas não-reduzidos.

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 é realizado com relativa facilidade. No entanto, a situação muda no caso das espécies diplospóricas autônomas, pois estas tendem a suprimir o pareamento cromossômico dos homólogos. Nestes casos, estudos de cariótipo são geralmente necessários. Porém, tais estudos em plantas comprovadamente apomíticas são infrequentes (COLEMAN, 1987). GRANT (1975) afirmou que, indubitavelmente, uma das principais razões para a baixa frequência de estudos de cariótipo é o alto número cromossômico da maioria das plantas apomíticas.

GRANT (1975) também afirma que a apomixia é uma adaptação evolutiva que evita as mudanças do

6. Significado evolutivo da apomixia:

A teoria de DARLINGTON (1939) para o significado evolutivo da apomixia foi uma das primeiras a serem formuladas. A hipótese da "escape from sterility" afirma que apomixia restringe a recombinação e, deste modo, a manutenção das espécies torna-se estabelecida. Deste ponto de vista, a principal vantagem da apomixia é restaurar a fertilidade dos indivíduos que, de outra forma, seriam sexualmente estéreis como uma consequência de poliploidia e hibridização.

CLAUSEN (1954) reconheceu que apomixia, particularmente apomixia facultativa, não necessariamente leva à perda de variabilidade e potencial evolutivo. Assim, a combinação de sexualidade, que leva à produção de genótipos novos, e apomixia, que permite a reprodução fiel destes genótipos, é altamente adaptativa. DE WET & STALKER (1974) afirmaram que espécies apomíticas são bem adaptadas porque são facultativamente sexuadas e não porque reproduzem-se apomiticamente. A posição de CLAUSEN é atualmente aceita por GRANT (1971) e MARSHALL & BROWN (1981).

GRANT (1971) também afirma que a apomixia é uma possibilidade de se



BARA (1989) relatou que espécies apomíticas facultativas são pioneiras na evolução, pois combinam as vantagens da reprodução sexuada (alto grau de heterozigosidade) e apomixia (estabilidade relativa e reprodução fiel de genótipos bem adaptados) assegurando uma taxa elevada de evolução adaptativa.

Evolução progressiva contínua é dependente da disponibilidade de variabilidade genética. Em espécies obrigatoriamente apomíticas, a perda de variação genética é o fator limitante primário para evolução (STRATTON, 1991). No entanto, mesmo nas plantas apomíticas obrigatórias existem fontes assexuadas de variabilidade. Considerando que as plantas agamospérmicas, frequentemente, são de origem híbrida, mesmo num nível baixo de reprodução sexuada ocorre a formação de uma ampla escala de tipos recombinantes que se perpetuam apomiticamente. Outro fator causador de variação nos grupos apomíticos é autosegregação (GUSTAFSSON, 1946-47), que se refere à mudanças do número cromossômico da oosfera e do embrião em consequência de irregularidades meióticas. LUKINA & YUDIN (1992) relataram um exemplo de autosegregação em híbridos de *Zea mays* X *Tripsacum dactyloides*. Neste cruzamento, usualmente, o híbrido resultante apresenta um genoma do milho adicional na oosfera não-reduzida. Reprodução subsexuada, segundo DARLINGTON (1958), também contribui para a variação pois embora não haja redução do número cromossômico, ocorre segregação de genes devido ao crossing-over que ocorre durante o pareamento heterogenético, mesmo que seja em frequências baixas. Mutações genéticas em geral são proporcionalmente mais importantes nos organismos assexuados do que nos sexuados, e as plantas apomíticas, especialmente aquelas que são obrigatoriamente apomíticas, não formam exceção.

7. Apomixia e melhoramento vegetal:

A presença de apomixia em algumas espécies de plantas pode auxiliar em programas de melhoramento vegetal. A disponibilidade de híbridos é a base de qualquer programa de melhoramento. Nas plantas apomíticas existem possibilidade de se



influenciar o grau de apomixia aumentando a taxa de hibridização.

De acordo com RICHARDS (1986) agamospermia é muito rara em plantas de interesse econômico, sendo que os casos mais bem conhecidos estão entre o gênero *Citrus* (laranja, limão etc) e *Mangifera* (manga), embora ocorra também em pera, alcaparra, amora, maçã e em algumas gramíneas forrageiras.

Atualmente, um dos aspectos mais importantes na área de melhoramento vegetal é a tentativa de se introduzir apomixia em plantas sexuadas, em especial àquelas que não estão disponíveis para multiplicação vegetativa em grande escala, particularmente, os cereais. Nestes casos é necessário encontrar, em populações naturais, elementos da apomixia, como mutantes com distúrbios na meiose da megasporogênese, tendência para originar saco-embriônico reduzido e desenvolvimento partenogenético (NOGLER, 1984a).

De acordo com HANNA & BASHAW (1987) a transferência de apomixia para cereais torna possível a produção e comercialização de híbridos sem a necessidade de altos custos e processos laboratoriais intensos, uma vez que vários mecanismos apomíticos estão sob controle gênico e, deste modo, podem ser manipulados em programas de melhoramento vegetal.

CARMAN (1992) relatou alguns casos de transferência de apomixia de um gênero apomítico para outro gênero relacionado, sexuado e de interesse econômico, como por exemplo a transferência de apomixia para o gênero *Triticum* a partir da espécie hexaplóide *Elymus rectisetus* e a transferência de apomixia de *Tripsacum* para *Zea mays*.

Segundo NOGLER (1984a) as razões para o interesse no fenômeno apomítico são óbvias. Reprodução apomítica fixa combinações gênicas heterozigotas com propriedades agrônomicas valiosas como, por exemplo, genes para resistência à doenças.

8. A família Compositae e o gênero *Eupatorium*: caracterização geral:

As Compositae constituem uma das maiores famílias de plantas, contendo aproximadamente 1000 gêneros com cerca de 20000



espécies conhecidas atualmente, com uma ampla distribuição geográfica, sendo muito bem representada em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (CRONQUIST, 1988).

Este grupo é constituído, na sua grande maioria, de espécies herbáceas, sub-arbustivas ou arbustivas. A característica de folhas opostas ocorre em vários gêneros. A forma das folhas é muito variável e pode, algumas vezes, ser utilizada para caracterizar alguns grupos. O atributo mais importante que as Compositae apresentam é a sua inflorescência típica, o capítulo, que se caracteriza por uma estrutura racemosa, constituída de muitas flores dispostas sobre um receptáculo, cercado por brácteas involucrais que atuam como sépalas. O involúcro pode ter funções relacionadas com época de floração, frutificação, proteção de flores e frutos em desenvolvimento, atração de polinizadores e auxílio na liberação de aquênios maduros (RUAS, 1989).

A família pode ser reconhecida com base na morfologia da flor que apresenta corolas gamopétalas com 5 lóbulos, a presença comum do cálice modificado em forma de "pappus", o ovário ínfero, bicarpelar e uniloculado contendo um único óvulo basal, e 5 estames, epipétalos, com as anteras unidas pelas margens. O fruto é um aquênio que apresenta uma fina e inconspícua camada de endosperma (LAWRENCE, 1958; PORTER, 1959).

Segundo CRONQUIST (1988), a família Compositae é uma das famílias das Angiospermas mais bem sucedidas, sendo representada por numerosos gêneros, espécies e indivíduos, podendo-se afirmar que estas plantas exploraram a maioria das oportunidades ecológicas disponíveis às Angiospermas.

Como tradicionalmente reconhecido, *Eupatorium*, da tribo Eupatorieae, família Compositae, é um gênero de mais de 500 espécies, predominantemente perenes, com distribuição geográfica quase cosmopolita, porém concentradas nas regiões tropicais das Américas (MONTGOMERY & FAIRBROTHERS, 1970). Recentemente, a tribo Eupatorieae foi reinterpretada por KING e ROBINSON numa série de publicações, em que cerca de 95% das espécies foram transferidas de *Eupatorium* (sensu lato) para outros gêneros citados por



WHITTEMORE (1987). Segundo estes autores, *Eupatorium* é um gênero de menos de 40 espécies, todas nativas do hemisfério norte, sendo que as espécies da América tropical estão distribuídas entre diversos gêneros novos ou reativados (KING & ROBINSON, 1970; KING et al., 1976; ROBINSON & KING, 1980). De acordo com este sistema *E. intermedium* recebe o nome de *Grazielia intermedia* (DC) KING & ROBINSON e *E. pauciflorum*, *Praxelis pauciflora* (HBK) KING & ROBINSON (KING & ROBINSON, 1987). Neste trabalho seguiremos o conceito tradicional do gênero, pois consideramos que esta abordagem facilitará a comunicação, e também devido ao fato de que o tratamento de KING e ROBINSON ainda não conseguiu ampla aceitação.

O gênero *Eupatorium* é reconhecido por apresentar capítulos de 5 a 100 flores, flores tubulosas, hermafroditas, de cor púrpura ou branca, cujas corolas apresentam 5 lóbulos. Este gênero é constituído de espécies arbustivas, sub-arbustivas ou herbáceas, perenes e raramente anuais, sendo bem representado na flora do Brasil. BAKER (1884) tratou de 151 espécies 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.

Embora já há muito tempo uma alta incidência de apomixia seja conhecida no gênero *Eupatorium* (NYGREN, 1954; FRYXELL, 1957), surpreendentemente pouca pesquisa têm sido realizada sobre a ocorrência do fenômeno no gênero. Números cromossômicos de algumas espécies brasileiras já foram determinados (COLEMAN, 1968). O primeiro estudo de agamospermia no gênero foi realizado por HOLMGREN (1919), em *E. glandulosum*, espécie triplóide ($2n=51$), nativa da América do Norte, na qual foi constatada diplosporia obrigatória associada à desenvolvimento autônomo do endosperma. SPARVOLI (1960) demonstrou a presença de diplosporia também em *E. riparium*. FRYXELL (1957) sugeriu a possibilidade de várias outras espécies triplóides do gênero também serem apomíticas, porém, ele não citou os nomes destas espécies e não realizou os estudos necessários para comprovar a existência de apomixia. TURNER &



IRWIN (1960) sugeriram a possível existência de apomixia em *E. kleinoides*, espécie tetraplóide ($n=20$), brasileira, em que eles observaram irregularidades na meiose da microsporogênese.

ROZENBLUM et al. (1988) constataram grandes anormalidades durante a microsporogênese em *E. tanacetifolium*. Esta espécie apresenta diplosporia sendo que, tanto o embrião quanto o endosperma, têm capacidade de desenvolvimento partenogenético.

COLEMAN & COLEMAN (1984; 1988) E COLEMAN (1989) realizaram estudos detalhados de agamospermia em três espécies triplóides ($2n=30$) brasileiras: *E. bupleurifolium*, *E. callilepis* e *E. squalidum* e em uma espécie hexaplóide ($2n=60$): *E. odoratum*. O estudo da megasporogênese e formação do saco-embriônário nestas espécies revelou que, apenas *E. bupleurifolium*, demonstra aposporia, enquanto as outras três espécies caracterizam-se por serem diplospóricas, e todas elas apresentam desenvolvimento autônomo do endosperma.

9. Objetivos:

Este estudo teve por objetivo investigar o modo de reprodução de duas espécies do gênero *Eupatorium*: *E. intermedium* e *E. pauciflorum*, visando o esclarecimento da ocorrência ou não de apomixia, correspondendo às seguintes etapas:

- Desenvolvimento do gametófito feminino;
- Estudo da microsporogênese e formação de grãos-de-pólen;
- Estudo do cariótipo;
- Verificação da ocorrência de polinização;
- Determinação da germinabilidade e produção de sementes.

Eupatorium pauciflorum Vahl., classificada na Seção *Praxifolia* e espécie anual, invasora, herbácea, caule ramificado, com até 1 m de altura, medindo 20-75 cm de altura, com inflorescências axilares, brácteas grandes, membráceas, subscáptas, com nervos glandulares na face inferior, medindo 5-10 cm de comprimento, de coloração verde, terminais em capítulos solitários, com brácteas grandes, sendo a flor hermafrodita, constituída de corola tubulosa de coloração azul, de acordo com

II. MATERIAL E MÉTODOS

A escolha destas duas espécies foi devida ao fato de que *Eupatorium intermedium* e *E. pauciflorum* são espécies contrastantes. *E. pauciflorum* é planta anual, altamente invasora, ocorrendo em habitats perturbados, enquanto *E. intermedium* é perene, não-invasora, ocorrendo em habitats estáveis. Além disso, *E. intermedium* era registrada na literatura como sendo uma espécie diplóide ($2n=2x=20$) enquanto *E. pauciflorum* foi constatada como sendo uma espécie triplóide ($2n=3x=30$), o que sugeriu a ocorrência de apomixia nesta espécie. A escolha destas duas espécies também visou dar continuidade a um projeto de pesquisa que investiga a citogenética e embriologia de espécies do gênero *Eupatorium*.

A determinação de apomixia ou sexualidade em espécies de diferentes níveis de ploidia é fundamental para o melhor entendimento da evolução e sistemática de um grupo, desde que podemos supor que espécies diplóides e sexuadas são ancestrais em relação à espécies poliplóides e apomíticas.

Eupatorium intermedium D.C., classificada na Seção *Heterolepis* é uma planta não-invasora, de hábito perene, sub-arbustiva, podendo atingir até 2 metros de altura, com reprodução por sementes. As flores são brancas, com os capítulos contendo 5 flores. As folhas são opostas, lanceoladas e pubescentes podendo medir até 12 cm. Habita os campos de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso e Rio Grande do Sul. Os capítulos utilizados nesta investigação foram coletados de populações naturais no Parque do Estado de São Paulo, São Paulo, SP (figura 1).

Eupatorium pauciflorum H.B.K., classificada na Seção *Praxelis* é espécie anual, invasora, herbácea, ereta, ramificada, com caule denso-piloso, medindo 40-70 cm de altura, com reprodução por sementes. As folhas são opostas, membranáceas, pubescentes com pêlos glandulares na face inferior, medindo 5-10 cm de comprimento. As inflorescências são terminais em capítulos solitários ou em curtos racemos, sendo a flor hermafrodita, constituída de corola tubulosa de coloração azul. De acordo com



LORENZI (1982) é uma planta daninha muito comum em solos cultivados ou não, de comum ocorrência na região centro-sul do Brasil. Os capítulos utilizados neste trabalho foram coletados de populações naturais na cidade de São José do Rio Preto, SP (figura 7).

O tamanho das amostras utilizadas, em todas as etapas desta investigação, foi selecionado em razão da disponibilidade de material de cada uma das espécies, levando-se em consideração a uniformidade dos resultados obtidos, que refletem a variação que ocorre nas populações estudadas.

Para o estudo de megasporogênese e desenvolvimento do saco-embriônico, botões florais em várias fases de desenvolvimento, bem como flores abertas, foram fixados em F.A.A. (JOHANSEN, 1940), (ver apêndice, página 91) e guardados sob refrigeração. Os óvulos contidos nos ovários foram retirados, sob lupa com auxílio de estiletes, e colocados em solução clarificadora (HERR, 1971, 1972, 1982), (ver apêndice, página 91) durante 24 horas. Após a clarificação, foram transferidos para uma lâmina contendo meio de Hoyer (ALEXOPOULOS & BENKE, 1952), (ver apêndice, página 92) e cobertos por lamínula, tendo sido levados ao microscópio para análise e seleção para fotografias.

Com a finalidade de se verificar o conteúdo dos óvulos foi realizado um estudo observando-se flores nas fases iniciais de desenvolvimento, pré-antese e antese. Como fase pré-antese foram considerados os botões florais com os estigmas ainda contidos dentro do botão, em geral, consideradas como sendo até 24 horas antes da antese. A antese se caracteriza pela exposição dos estigmas, evidentemente, receptivos. Foram estudados ainda óvulos em fases iniciais de desenvolvimento, a fim de se verificar a sequência de desenvolvimento da megasporogênese a partir do megasporócito.

Para o estudo de microsporogênese, botões florais em diversas fases de desenvolvimento foram fixados em solução de Carnoy (ver apêndice, página 91) durante 24 horas e em seguida transferidos para etanol 70% e guardados em geladeira. A microsporogênese foi estudada pela técnica de esmagamento



(DARLINGTON & LA COUR, 1970) que 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 colocado carmim acético (ver apêndice, página 91) e, então, realiza-se a maceração das mesmas, com auxílio de uma espátula e o excesso do material visível a olho nu, é retirado. A seguir, o material é coberto com lamínula 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. 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.

Para os estudos de cariótipo, sementes foram germinadas sobre papel de filtro umedecido, em placas de petri. As raízes das plântulas foram removidas e pré-tratadas em oxiquinoleína 0,002M (ver apêndice, página 91), a uma temperatura de 15°C, sob aeração constante, durante 6 horas. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução de Carnoy, durante 15 minutos e transferidas para álcool 70%, no qual foram estocadas.

Para a análise do cariótipo, as pontas de raízes sofreram um processo de hidrólise em HCl 1N, a 60°C, durante 5 minutos, a fim de facilitar a separação das células, e, então, as raízes foram coradas em carmim acético por 30 minutos. Depois, 1 milímetro terminal da raiz foi removido e colocado em lâmina com uma gota de meio de Hoyer, sendo que, o meristema apical foi raspado com auxílio de um estilete e o material, coberto por lamínula para observação ao microscópio. Quando fases desejadas foram encontradas, aplicou-se pressão sobre a lamínula para achatar as células e espalhar os cromossomos. Metáfases favoráveis foram fotografadas e medidas feitas do comprimento total de cada cromossomo e dos braços longo e curto permitiram o cálculo da proporção de braços. Baseado nestas medidas foi determinado o cariótipo básico das duas espécies. A proporção dos braços longo e curto quanto à posição do centrômero foi baseada no esquema de DYER (1979) e LEVAN et al. (1964), onde 1:1= metacêntrico, 3:1= acrocêntrico e 1:0= telocêntrico.



Para o estudo da ocorrência de polinização os estigmas foram retirados da flor, corados em carmim acético durante 24 horas e, em seguida, montados em lâmina contendo meio de Hoyer.

Para o estudo da germinabilidade as sementes foram semeadas sobre papel de filtro umidecido em placas de petri e colocadas para germinar à temperatura ambiente ou no germinador com temperatura e umidade controladas. O número de sementes que germinava a cada dia, durante todo o experimento, foi anotado e ao final, obteve-se uma porcentagem de germinação para cada espécie.

Para o estudo da produção de sementes utilizou-se plantas de populações naturais, analisando-se o número de flores que produziram sementes em cada planta examinada, obtendo-se, deste modo, a porcentagem de produção de sementes para cada espécie.

O filme usado para as fotografias foi o COPEX PAN AHU PET 13 F. O papel fotográfico empregado nas cópias de megasporogênese e desenvolvimento do saco-embriológico e microsporogênese e formação de grãos-de-pólen, foi o Kodabrome Print R C F3, enquanto que, para a análise de cariótipo foi utilizado o papel Kodabromide F4. Os equipamentos ópticos utilizados foram um estereomicroscópio Zeiss SRBr e um fotomicroscópio Zeiss Standard WL, equipado com contraste de fase, tendo acoplado uma máquina fotográfica.

O estudo da megasporogênese e desenvolvimento do saco-embriológico foi realizado por duas técnicas: a primeira, com o uso de lâminas de vidro, e a segunda, com o uso de lâminas de vidro e de lâminas de vidro. O estudo da microsporogênese e formação de grãos-de-pólen foi realizado com o uso de lâminas de vidro e de lâminas de vidro. O estudo da polinização foi realizado com o uso de lâminas de vidro e de lâminas de vidro. O estudo da germinabilidade das sementes foi realizado com o uso de lâminas de vidro e de lâminas de vidro. O estudo da produção de sementes foi realizado com o uso de lâminas de vidro e de lâminas de vidro.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se o teste de t de Student, com o auxílio do programa de computador.



III. RESULTADOS

1. *Eupatorium intermedium*:

1.1 Embriologia:

As observações realizadas sobre a embriologia de *E. intermedium* tiveram como objetivo verificar a megasporogênese, o desenvolvimento do saco-embriológico bem como o desenvolvimento do embrião e endosperma, visando a determinação do modo de reprodução, se apomítico ou sexuado.

A análise do conteúdo de óvulos clarificados, em fases iniciais de desenvolvimento, revelou a presença de um megasporócito (figura 2a) que sofre uma primeira divisão meiótica para formar uma díade (figura 2b), a qual, rapidamente, sofre uma segunda divisão meiótica para produzir uma tétrade de megásporos (figura 2c). A frequência de tétrades observada (tabela 1) indica que redução é característica regular da megasporogênese, nesta espécie. O megásporo da região chalazal é funcional e aumenta de tamanho, esmagando os três megásporos da região micropilar, formando o saco-embriológico uninucleado (figura 2d). Enquanto o saco-embriológico continua a se alongar uma divisão mitótica dá origem ao saco-embriológico binucleado (figura 2e). A seguir, uma segunda divisão mitótica dá origem ao saco-embriológico tetranucleado (figura 2f). Estes núcleos, ao sofrerem uma terceira divisão produzem o saco-embriológico maduro, com 8 núcleos, composto por duas sinérgides, uma oosfera, dois núcleos polares e três antípodas. O saco-embriológico, portanto, é do tipo *Polygonum*, o que, aparentemente, é típico para a família. As sinérgides degeneram rapidamente, resultando em um saco-embriológico com a oosfera e os dois núcleos polares (figura 3a). Os núcleos polares regularmente se fundem para formar o núcleo central (figura 3b). A oosfera, invariavelmente, permanece até a antese ainda sem se dividir, excluindo a possibilidade de embrionia precoce, que tem sido observada na maioria das espécies apomíticas do gênero que têm sido estudadas embriologicamente.

Observou-se que a formação do embrião se dá anteriormente à formação do endosperma, resultando na presença de

embrião e núcleo central. Após a fertilização do núcleo central observamos a presença de embrião e endosperma (figuras 3c e 3d). A presença de embrião e endosperma foi constatada apenas em óvulos de flores já abertas e, assim, com possibilidade de terem sido polinizadas.

Foram analisadas 5 plantas desta espécie, tendo sido examinados um total de 1296 óvulos. Destes, 731 estavam em fases iniciais de desenvolvimento: 147 estavam em pré-antese e 418 estavam em antese. O conteúdo dos óvulos de *E. intermedium* nas diferentes fases de desenvolvimento estão resumidos na tabela 1.

Na análise de 1296 óvulos nos três estágios de desenvolvimento foi observada a presença de megasporócitos, díades e tétrades de megásporos, saco-embriônico uninucleado, saco-embriônico binucleado, saco-embriônico tetranucleado, oosfera/núcleos polares, oosfera/núcleo central, embrião/núcleo central, embrião/endosperma, além de sacos-embriônicos abortados.

Para 731 óvulos examinados nas fases iniciais de desenvolvimento, 12,17% correspondem a megasporócitos, 0,69%, a díades e 6,43%, a tétrades de megásporos. 4,79% dos óvulos analisados correspondem a sacos-embriônicos uninucleados, 5,74% à sacos-embriônicos binucleados e 7,93% à sacos-embriônicos tetranucleados. A proporção de oosfera/núcleos polares foi maior nesta fase (7,80%) sendo que a proporção de oosfera/núcleo central (51,71%) é a maior em relação às outras fases. A presença de embrião/núcleo central e embrião/endosperma não foi constatada nesta fase.

Dos 147 óvulos examinados na fase de pré-antese não foi constatada a presença de megasporócitos, díades e tétrades de megásporos, sacos-embriônicos uninucleado, binucleado e tetranucleado, com uma diminuição da proporção de oosfera/núcleos polares em relação à fase anterior (5,44%). Oosfera/núcleo central corresponde a 91,84% dos óvulos examinados, sendo que, em nenhum deles foi constatada a presença de embrião/núcleo central e embrião/endosperma.



Para 418 óvulos analisados na fase de antese não foi observada a presença dos estágios iniciais de desenvolvimento do saco-embriônico (megasporócitos, díades e tétrades de megásporos, sacos-embriônicos uninucleado, binucleado e tetranucleado e oosfera/núcleos polares). A proporção de oosfera/núcleo central foi de 47,23%, enquanto a de embrião/núcleo central foi de 0,72% e a de embrião/endosperma, 17,22%. Como podemos notar a análise do conteúdo dos óvulos revelou a presença de embrião e endosperma somente em óvulos de flores em fase de antese, quando as flores já estão abertas permitindo, assim, polinização.





Figura 1. *Eupatorium intermedium* D.C.

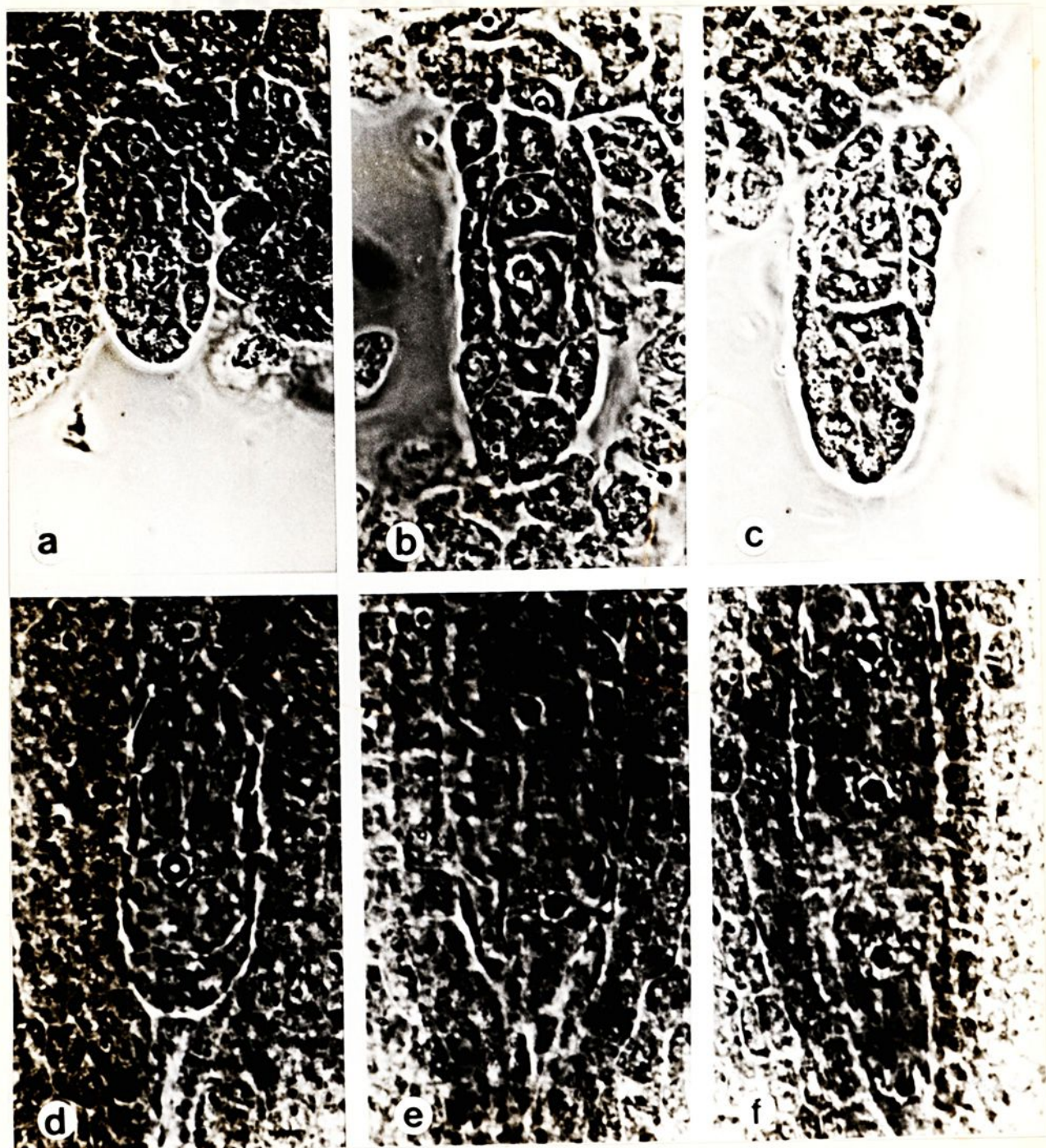


Figura 2. Formação do saco-embriônico em *Eupatorium intermedium*.
 a. Megasporócito; b. Díade de megásporos; c. Tétrade de megásporos; d. Saco-embriônico uninucleado; e. Saco-embriônico binucleado; f. Saco-embriônico tetranucleado. a,b,c,d,e e f, 925x.

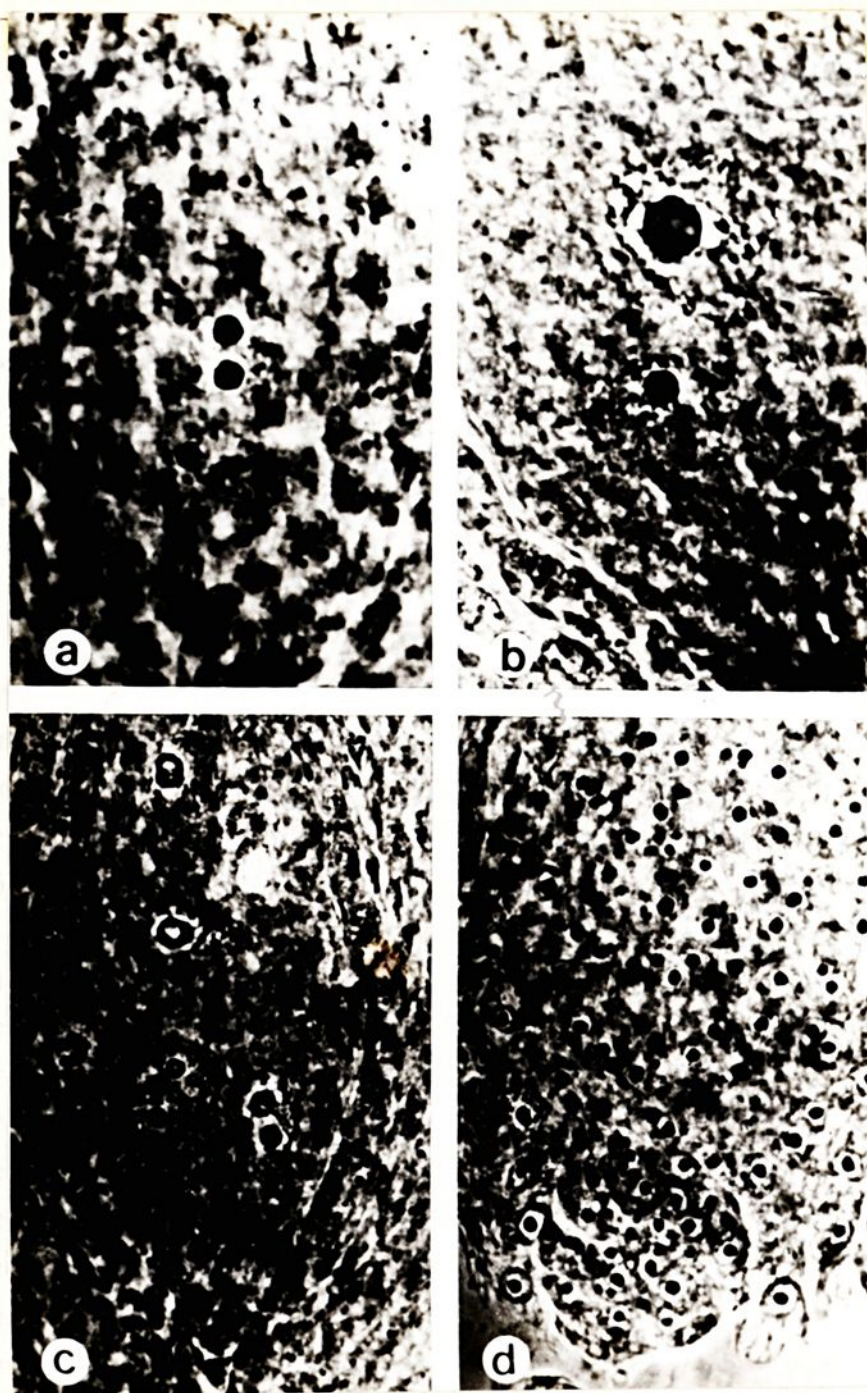


Figura 3. Formação do saco-embriônico em *Eupatorium intermedium* (continuação). a. Saco-embriônico com oosfera e dois núcleos polares; b. Saco-embriônico com oosfera e núcleo central; c. Saco-embriônico com divisões iniciais do embrião e endosperma; d. Embrião (fase globular) e endosperma. a, 650x; b, 925x; c, 460x; d, 440x.

Tabela 1. Conteúdo de óvulos de *E. intermedium* em diferentes estágios de desenvolvimento floral

Conteúdo	Estágio Floral					
	Fase Inicial		Pré-Antese		Antese	
Plantas examinadas	05		05		05	
Óvulos examinados	731		147		418	
Saco-embrionário abortado	20	2,74%	04	2,72%	62	14,83%
Megasporócito	89	12,17%	0		0	
Díade de megásporos	05	0,69%	0		0	
Tétrade de megásporos	47	6,43%	0		0	
Saco-embrionário 1-nucleado	35	4,79%	0		0	
Saco-embrionário 2-nucleado	42	5,74%	0		0	
Saco-embrionário 4-nucleado	58	7,93%	0		0	
Oosfera e núcleos polares	57	7,80%	08	5,44%	0	
Oosfera e núcleo central	378	51,71%	135	91,84%	281	67,23%
Embrião e núcleo central	0		0		03	0,72%
Embrião e endosperma	0		0		72	17,22%

1.2 Microsporogênese:

A análise da microsporogênese em *Eupatorium intermedium* mostrou que os microsporócitos em fase de meiose apresentam cromossomos estendidos e, aparentemente, pareados durante paquíteno (figura 4a). A normalidade de pareamento é bastante evidente em diacinese (figura 4b), sendo possível observar a presença de 10 bivalentes. A separação dos homólogos ocorre, sendo possível observar anáfase I com 10 cromossomos em cada um dos pólos (figura 4c). A segunda divisão da meiose produziu tétrade de micrósporos normalmente (figura 4d). O micrósporo uninucleado (figura 5a) sofre mitose, resultando em dois núcleos (figura 5b) que se afastam um do outro, dando origem à célula vegetativa e à célula generativa (figura 5c). Em seguida, a célula generativa sofre uma segunda mitose (figura 5d) dando origem aos dois núcleos masculinos (figura 5e). Nesta espécie, os grãos-de-pólen são liberados na condição trinucleada, o que é típico para a família. A regularidade da microsporogênese e formação de pólen indicam alta fertilidade masculina para o material estudado.



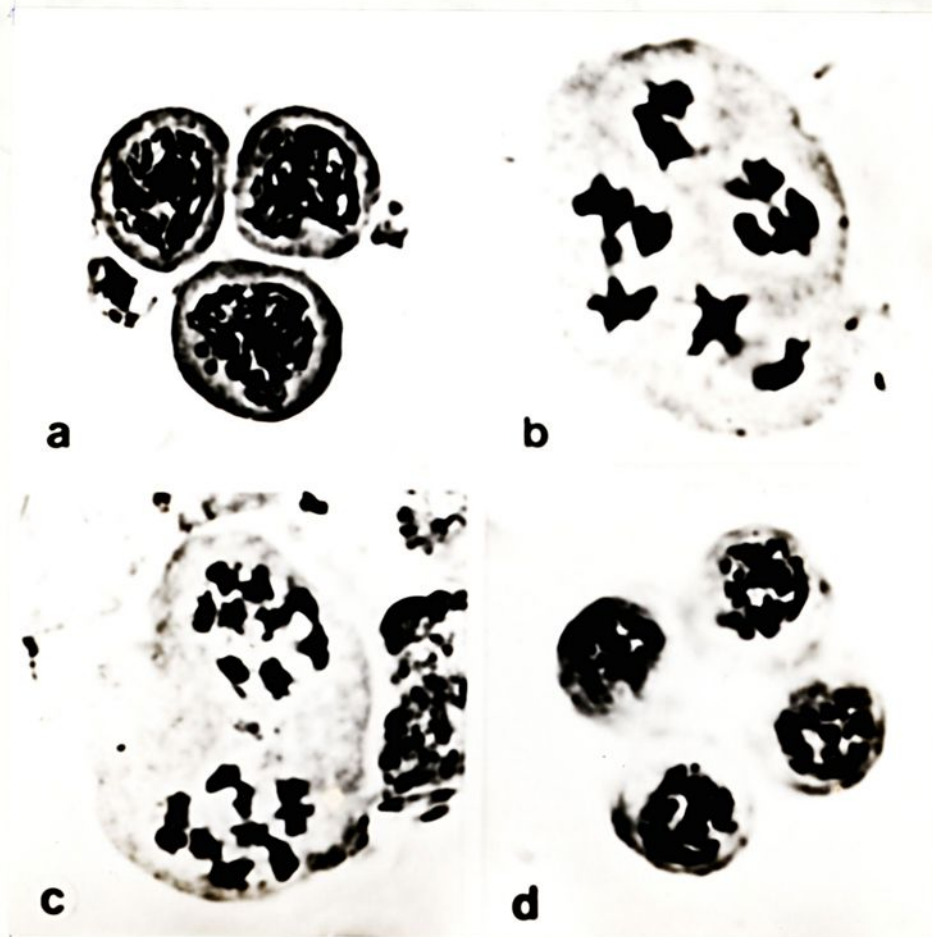


Figura 4. Microsporogênese em *Eupatorium intermedium*. a. Três microsporócitos em paquíteno; b. Diacinese mostrando 10 bivalentes; c. Anáfase I com 10 cromossomos em cada um dos pólos; d. Tétrade de microsporos. a, 1425x; b, c, e d, 1600x.

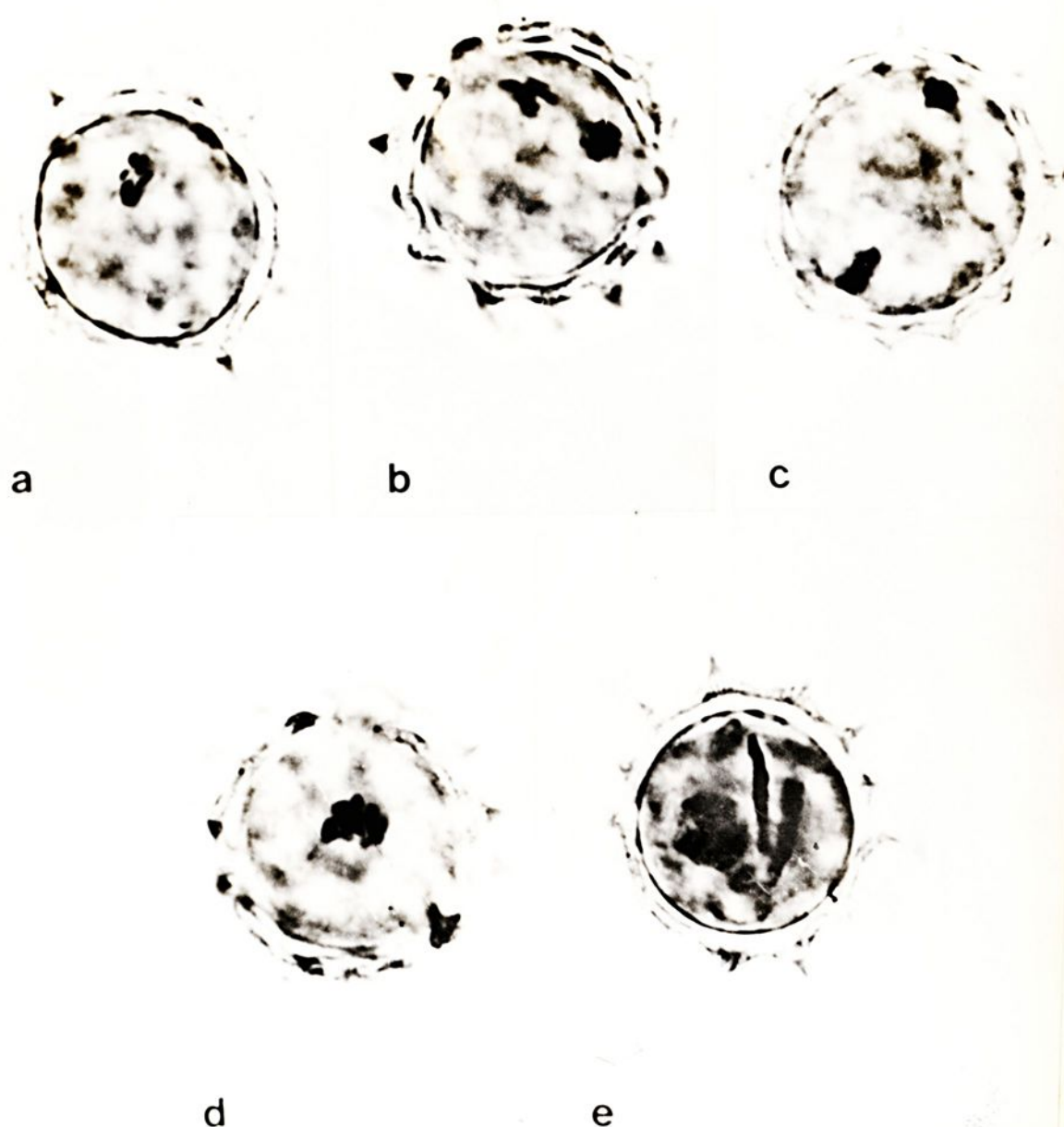


Figura 5. Microgametofitogênese em *Eupatorium intermedium*. a. Microsporo uninucleado (metáfase); b. Microsporo em anáfase I; c. Microsporo binucleado (células vegetativa e generativa); d. Microsporo com célula generativa em metáfase; e. Microsporo trinucleado (célula vegetativa e dois núcleos masculinos). a,b,c,d, e e, 1600x.

1.3 Cariótipo: 2n = 20. Quanto ao tamanho, os cromossomos medem

Segundo STEBBINS (1971), num estudo de cariótipo, cinco características devem ser observadas: a. diferenças no tamanho absoluto dos cromossomos; b. diferenças na posição do centrômero; c. diferenças no tamanho relativo dos cromossomos; d. diferenças no número básico; e. diferenças no número e posição dos satélites.

A análise do cariótipo foi realizada em seis células, sendo que cada célula representa uma plântula. A figura 6a apresenta uma destas células. As medidas cromossômicas de cada uma das seis células, incluindo braços longo e curto, comprimento total dos braços, proporção dos braços e comprimento relativo em relação ao comprimento total do complemento cromossômico, estão apresentadas nas tabelas de 2 a 7. Com base nestas medidas foi possível reunir os 20 cromossomos do complemento em 10 grupos, cada grupo contendo 2 cromossomos, indicando ser o complemento cromossômico constituído de um único genoma representado duas vezes. A figura 6b apresenta o complemento cromossômico de uma das seis células analisadas, em metáfase, com os cromossomos, presumivelmente homólogos, agrupados.

A tabela 8 caracteriza o genoma da espécie e foi baseada nas médias dos valores obtidos da análise das seis células. Assim, os valores de cada cromossomo nesta tabela representam 12 cromossomos considerados equivalentes, 2 de cada uma das seis células. O braço longo variou de 1,75µm (cromossomos 9 e 10) a 2,53µm (cromossomo 2); o braço curto, de 0,90µm (cromossomo 8) a 1,61µm (cromossomo 1) e o comprimento total dos cromossomos variou de 2,66µm (cromossomo 10) a 4,07µm (cromossomo 1). Quanto à proporção entre os braços, os valores extremos foram 1,21 (cromossomo 5) a 2,53 (cromossomo 8) e, para a proporção comprimento total do genoma os extremos foram 7,95 (cromossomo 10) a 12,20 (cromossomo 1).

Nas tabelas 2 a 7 a ordenação dos cromossomos foi baseada no comprimento. No entanto, devido à variação gradual no comprimento cromossômico, a proporção dos braços foi essencial para se agrupar os cromossomos homólogos, visando a



caracterização do genoma. Quanto ao tamanho, os cromossomos medem de 2,66 μ m a 4,07 μ m, sendo que o comprimento total do genoma é de 33,36 μ m.

Quanto à posição do centrômero todos os cromossomos são submetacêntricos. O cromossomo mais próximo de ser acrocêntrico é o cromossomo número 8, com a proporção de braços de 2,53 e o cromossomo mais próximo de ser metacêntrico é o número 5, com a proporção de braços de 1,21. Devido ao seu maior comprimento, os cromossomos 1 e 2 são os mais facilmente distinguíveis no genoma. Os demais cromossomos são mais difíceis de serem identificados em consequência de sua menor diferenciação morfológica, como indicam o cariótipo e o idiograma apresentados nas figuras 6b e 6c, respectivamente. Apenas em uma das células analisadas foi possível visualizar a presença de cromossomos SAT (célula 1). Os satélites, em número de dois, aparentemente, ocorrem no mesmo par cromossômico que apresenta a maior proporção de braços, correspondendo, nesta célula, ao cromossomo número 10 (figura 6, tabela 2).



Figura 6. *Crustaceum*, subfilum Crustacea, classe Crustacea, ordem Decapoda, subordem Decapoda, família Decapoda, gênero *Crustaceum*. a. Célula mitótica em anáfase mostrando 10 cromossomos. b. Cariótipo de *Crustaceum*, célula representativa. Os satélites indicam a presença de cromossomos SAT.

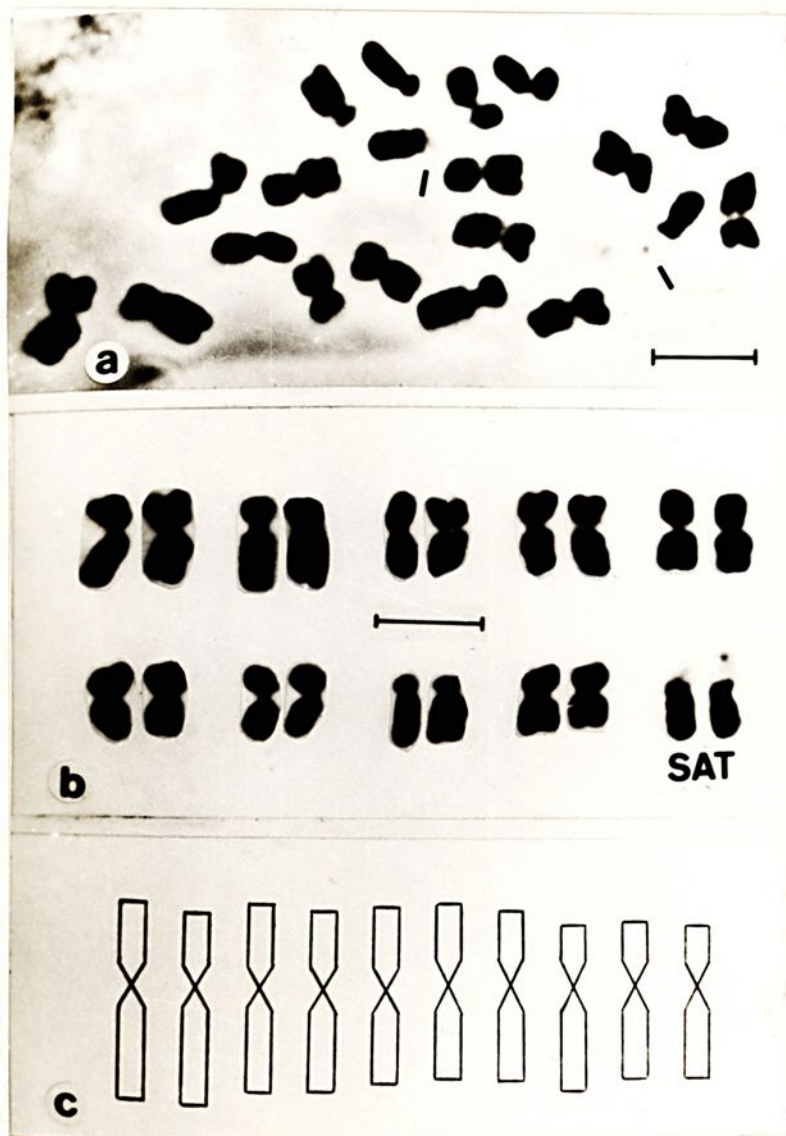


Figura 6. Cromossomos mitóticos de *Eupatorium intermedium*. a. Célula mitótica em metáfase mostrando 20 cromossomos; b. Cariótipo; c. Idiograma. Escala representa 5 μ m; linhas indicam satélites.

Tabela 2. Medidas (μm) de cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 1 de *E. intermedium* (Comprimento total do complemento: $66,90\mu\text{m}$)

Par	Braço cromossômico		Comprimento total (L+C)	Proporção de braços (L/C)	Comprimento relativo %
	(L)	(C)			
1 a	2,40	1,73	4,13	1,38	6,17
b	2,27	1,60	3,87	1,42	5,78
2 a	2,67	1,34	4,01	2,00	5,99
b	2,40	1,34	3,74	1,80	5,59
3 a	2,00	1,73	3,73	1,16	5,57
b	2,00	1,60	3,60	1,25	5,38
4 a	2,08	1,60	3,68	1,30	5,50
b	2,13	1,34	3,47	1,58	5,19
5 a	1,87	1,73	3,60	1,08	5,38
b	1,73	1,60	3,33	1,08	4,98
6 a	1,92	1,47	3,39	1,30	5,07
b	1,73	1,47	3,20	1,18	4,78
7 a	1,87	1,34	3,21	1,39	4,80
b	1,87	1,34	3,21	1,39	4,80
8 a	2,27	0,80	3,07	2,83	4,59
b	2,13	0,80	2,93	2,66	4,38
9 a	1,60	1,20	2,80	1,34	4,18
b	1,47	1,20	2,67	1,23	3,99
10a	2,00	0,67	2,67	2,98	3,99
b	1,92	0,67	2,59	2,86	3,87

66,90

Tabela 3. Medidas (μm) de cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 2 de *E. intermedium* (Comprimento total do complemento: 49,61 μm)

Par	Braço cromossômico		Comprimento total (L+C)	Proporção de braços (L/C)	Comprimento relativo %
	(L)	(C)			
1 a	1,87	1,47	3,34	1,27	6,73
b	1,79	1,52	3,31	1,18	6,67
2 a	2,13	1,07	3,20	1,99	6,45
b	1,92	0,93	2,85	2,06	5,74
3 a	1,60	1,33	2,93	1,20	5,91
b	1,60	1,07	2,67	1,50	5,38
4 a	1,49	1,20	2,69	1,24	5,42
b	1,47	1,20	2,67	1,23	5,38
5 a	1,33	1,20	2,53	1,11	5,10
b	1,33	1,20	2,53	1,11	5,10
6 a	1,39	1,07	2,46	1,30	4,96
b	1,33	1,07	2,40	1,24	4,84
7 a	1,33	1,12	2,45	1,19	4,94
b	1,37	0,93	2,26	1,43	4,56
8 a	1,73	0,67	2,40	2,58	4,84
b	1,73	0,67	2,40	2,58	4,84
9 a	1,47	0,93	2,40	1,58	4,84
b	1,41	0,93	2,34	1,52	4,72
10a	1,33	0,80	2,13	1,66	4,29
b	1,25	0,80	2,05	1,56	4,13

Tabela 4. Medidas (μm) de cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 3 de *E. intermedium* (Comprimento total do complemento: $67,47\mu\text{m}$)

Par	Braço cromossômico		Comprimento total (L+C)	Proporção de braços (L/C)	Comprimento relativo %
	(L)	(C)			
1 a	2,40	1,86	4,26	1,29	6,31
b	2,13	2,00	4,13	1,07	6,12
2 a	2,93	1,33	4,26	2,20	6,31
b	2,53	0,80	3,33	3,16	4,93
3 a	2,26	1,73	3,99	1,31	5,91
b	2,13	1,73	3,86	1,31	5,72
4 a	2,00	1,86	3,86	1,08	5,72
b	1,86	1,73	3,59	1,08	5,32
5 a	2,13	1,60	3,73	1,33	5,53
b	2,26	1,46	3,72	1,55	5,51
6 a	1,86	1,46	3,32	1,27	4,92
b	1,86	1,46	3,32	1,27	4,92
7 a	2,40	0,80	3,20	3,00	4,74
b	2,40	0,53	2,93	4,53	4,34
8 a	1,60	1,33	2,93	1,20	4,34
b	1,60	1,33	2,93	1,20	4,34
9 a	2,13	0,66	2,79	3,23	4,14
b	1,60	0,53	2,13	3,02	3,16
10a	1,46	1,20	2,66	1,22	3,94
b	1,60	0,93	2,53	1,72	3,75

Tabela 5. Medidas (μm) de cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 4 de *E. intermedium* (Comprimento total do complemento: $66,00\mu\text{m}$)

Par	Braço cromossômico		Comprimento total (L+C)	Proporção de braços (L/C)	Comprimento relativo %
	(L)	(C)			
1 a	2,80	1,46	4,26	1,92	6,45
b	2,66	1,20	3,86	2,22	5,85
2 a	2,26	1,73	3,99	1,31	6,05
b	2,26	1,73	3,99	1,31	6,05
3 a	2,13	1,73	3,86	1,23	5,85
b	2,00	1,60	3,60	1,25	5,45
4 a	2,00	1,46	3,46	1,37	5,24
b	1,86	1,33	3,19	1,40	4,83
5 a	1,73	1,60	3,33	1,08	5,05
b	1,73	1,46	3,19	1,18	4,83
6 a	1,86	1,46	3,32	1,27	5,03
b	1,73	1,33	3,06	1,30	4,64
7 a	1,60	1,60	3,20	1,00	4,85
b	1,60	1,60	3,20	1,00	4,85
8 a	2,26	0,80	3,06	2,83	4,64
b	2,13	0,80	2,93	2,66	4,44
9 a	1,86	1,06	2,92	1,75	4,42
b	1,46	0,80	2,26	1,83	3,42
10a	1,86	0,80	2,66	2,33	4,03
b	1,86	0,80	2,66	2,33	4,03

Tabela 6. Medidas (μm) de cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 5 de *E. intermedium* (Comprimento total do complemento: $69,73\mu\text{m}$)

Par	Braço cromossômico		Comprimento total (L+C)	Proporção de braços (L/C)	Comprimento relativo %
	(L)	(C)			
1 a	3,06	1,33	4,39	2,30	6,30
b	2,40	1,33	3,73	1,80	5,35
2 a	2,53	1,60	4,13	1,58	5,92
b	2,13	1,60	3,73	1,33	5,35
3 a	2,66	1,33	3,99	2,00	5,72
b	2,66	1,20	3,86	2,22	5,54
4 a	2,66	1,20	3,86	2,22	5,54
b	2,53	1,20	3,73	2,11	5,35
5 a	2,00	1,73	3,73	1,16	5,35
b	1,73	1,60	3,33	1,08	4,78
6 a	1,86	1,60	3,46	1,16	4,96
b	1,86	1,60	3,46	1,16	4,96
7 a	1,86	1,46	3,32	1,27	4,76
b	1,73	1,33	3,06	1,30	4,39
8 a	2,66	0,66	3,32	4,03	4,76
b	2,13	0,66	2,79	3,23	4,00
9 a	2,13	0,93	3,06	2,29	4,39
b	1,86	1,06	2,92	1,75	4,19
10a	1,60	1,33	2,93	1,20	4,20
b	1,60	1,33	2,93	1,20	4,20

Tabela 7. Medidas (μm) de cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 6 de *E. intermedium* (Comprimento total do complemento: $80,55\mu\text{m}$)

Par	Braço cromossômico		Comprimento total (L+C)	Proporção de braços (L/C)	Comprimento relativo %
	(L)	(C)			
1 a	3,33	2,13	5,46	1,56	6,78
b	2,40	1,73	4,13	1,39	5,13
2 a	3,46	1,73	5,19	2,00	6,44
b	3,20	1,33	4,53	2,41	5,62
3 a	2,40	2,13	4,53	1,13	5,62
b	2,26	2,00	4,26	1,13	5,29
4 a	2,66	1,60	4,26	1,66	5,29
b	2,66	1,60	4,26	1,66	5,29
5 a	2,53	1,73	4,26	1,46	5,29
b	2,13	1,60	3,73	1,33	4,63
6 a	2,13	1,86	3,99	1,15	4,95
b	2,13	1,86	3,99	1,15	4,95
7 a	2,13	1,86	3,99	1,15	4,95
b	1,86	1,60	3,46	1,16	4,30
8 a	2,53	1,20	3,73	2,11	4,63
b	2,66	1,06	3,72	2,51	4,62
9 a	2,00	1,60	3,60	1,25	4,47
b	2,00	1,33	3,33	1,50	4,13
10a	2,53	0,80	3,33	3,16	4,13
b	2,00	0,80	2,80	2,50	3,48

Tabela 8. Médias ($\bar{X} \pm S\bar{X}$, em μm) dos braços longo (L) e curto (C) de 12 cromossomos das 6 células estudadas de *E. intermedium*. Comprimento total médio do genoma: $33,35\mu\text{m}$.

Cromossomo	L	C	L+C	L/C	L+C/
					33,35
1	$2,46 \pm 0,13$	$1,61 \pm 0,08$	$4,07 \pm 0,16$	1,56	12,20
2	$2,53 \pm 0,13$	$1,38 \pm 0,09$	$3,91 \pm 0,18$	1,93	11,70
3	$2,14 \pm 0,29$	$1,60 \pm 0,09$	$3,74 \pm 0,15$	1,39	11,20
4	$2,12 \pm 0,29$	$1,44 \pm 0,07$	$3,56 \pm 0,15$	1,49	10,67
5	$1,87 \pm 0,10$	$1,54 \pm 0,05$	$3,42 \pm 0,14$	1,21	10,20
6	$1,80 \pm 0,07$	$1,48 \pm 0,07$	$3,28 \pm 0,14$	1,23	9,83
7	$1,83 \pm 0,10$	$1,29 \pm 0,11$	$3,12 \pm 0,13$	1,65	9,30
8	$2,12 \pm 0,11$	$0,90 \pm 0,07$	$3,02 \pm 0,12$	2,53	9,00
9	$1,75 \pm 0,08$	$1,02 \pm 0,08$	$2,77 \pm 0,13$	1,86	8,30
10	$1,75 \pm 0,10$	$0,91 \pm 0,07$	$2,66 \pm 0,10$	2,06	7,95

33,55

1.4 Ocorrência de polinização:

Estudos complementares de contagem do número de grãos-de-pólen sobre estigmas de *Eupatorium intermedium* apontam um grande número destes sobre a superfície estigmática. Em muitos estigmas é possível observar a presença de tubo polínico, indicando que ocorreu germinação do pólen. Foram estudadas três plantas, num total de 90 pistilos examinados, sendo que 74,4% dos pistilos analisados apresentavam grãos-de-pólen germinados, numa média de 4,4 grãos germinados por pistilo como indicado na tabela 9.

1.5 Germinabilidade e Produção de sementes:

O estudo da germinação, nesta espécie, envolveu o acompanhamento de 60 sementes que foram colocadas para germinar no germinador. Ao final de 21 dias, um total de 41 sementes haviam germinado, revelando uma porcentagem de germinação de 68,3% conforme indicado na tabela 10.

Estudos complementares para verificar a produção de sementes contendo embriões foram realizados em 7 plantas de *Eupatorium intermedium*, num total de 1730 ovários examinados, das quais 48 (2,8%) produziram sementes como indicado na tabela 11.



Tabela 1a. Germinabilidade de *Eupatorium intermedium*.Tabela 9. Ocorrência de grãos-de-pólen em estigmas de *Eupatorium intermedium*.

Nº da planta	Nº de pistilos examinados	Pistilos com grãos		Grãos por pistilo		
		Nº	%	Variacão	Média	
1	30	15	50,0	1-7	1,2	
2	30	23	76,7	1-8	2,9	
3	30	29	96,7	1-34	9,3	
Total	90	67	74,4	1-34	4,4	

Tabela 10. Germinabilidade de *Eupatorium intemedium*.

Nº de sementes	Dias	Sementes germinadas
60	1	0
	2	0
	3	0
	4	1
	5	2
	6	3
	7	4
	8	4
	9	5
	10	5
	11	1
	12	5
	13	8
	14	3
	15	0
	16	0
	17	0
	18	0
	19	0
	20	0
Total		41 68,3%



2. *Eupatorium pauciflorum*:

2.1 Embriologia:

A análise de óvulos clarificados de *E. pauciflorum*, em fases iniciais de desenvolvimento, revelou a presença de uma única célula arquesporial inicial que funciona diretamente como megasporócito. Nas fases iniciais de desenvolvimento, 1938 óvulos foram examinados, sendo que em nenhum deles verificou-se a presença de díades e tétrades de megásporos, o que indica a ausência de meiose redutiva. A formação do saco-embriológico se faz a partir do megasporócito não-reduzido (figura 8a) que funciona diretamente como megásporo. O núcleo deste ao se dividir dá origem a um saco-embriológico binucleado (figura 8b), cujos núcleos se afastam tomando posição nas extremidades opostas da célula. Cada um dos núcleos sofre uma segunda divisão formando o saco-embriológico tetranucleado (figura 8c). Posteriormente, uma terceira divisão dará origem ao saco-embriológico maduro com 8 núcleos, composto de duas sinérgides, uma oosfera, dois núcleos polares e três antípodas sendo, portanto, considerado do tipo *Polygonum*. As sinérgides degeneram rapidamente, resultando em um saco-embriológico com a oosfera e os dois núcleos polares (figura 8d). Os núcleos polares, em seguida, se fundem dando origem ao núcleo central (figura 8e). A oosfera e o núcleo central se dividem partenogeneticamente iniciando o embrião e o endosperma, respectivamente (figura 8f). Observou-se que a oosfera inicia a formação do embrião antes do núcleo central começar a se dividir para formar o endosperma. A presença de embrião e endosperma foi constatada em óvulos de flores já nas fases iniciais de desenvolvimento (botões fechados) e, portanto, sem possibilidade de terem sido polinizadas.

Foram analisadas 5 plantas desta espécie, tendo sido estudados 1938 óvulos em fases iniciais de desenvolvimento, 672 em pré-antese e 1151 em antese, num total de 3761 óvulos examinados. Os resultados da análise do conteúdo dos óvulos de *E. pauciflorum* nas diferentes fases de desenvolvimento estão resumidos na tabela 12.



Na análise de um total de 3761 óvulos nas três fases consideradas foi observada a presença de megasporócitos, sacos-embrionário bi e tetranucleado, oosfera/núcleos polares, oosfera/núcleo central, embrião/núcleo central, embrião/endosperma, além de sacos-embrionários abortados.

Para 1938 óvulos examinados nas fases iniciais de desenvolvimento, 8,36% correspondem a megasporócitos, 9,08%, a sacos-embrionários binucleados e 7,64%, a sacos-embrionários tetranucleados. A proporção de oosfera/núcleos polares foi maior nesta fase (31,27%), comparada às fases seguintes. Oosfera/núcleo central corresponde a 27,91%. A proporção de embrião/núcleo central e embrião/endosperma (3,04% e 3,77%, respectivamente) foi menor do que nas fases pré-antese e antese.

Dos 672 óvulos examinados na fase de pré-antese não aparece o estágio de megasporócito, com diminuição na frequência de sacos-embrionários bi e tetranucleados e oosfera/núcleos polares em relação à fase anterior. Pode-se notar, entretanto, um aumento na proporção de oosfera/núcleo central, embrião/núcleo central e embrião/endosperma.

Para 1151 óvulos examinados na fase de antese, não ocorrem megasporócitos e sacos-embrionários binucleados, com uma marcante diminuição na porcentagem de sacos-embrionários tetranucleados (0,09%), oosfera/núcleos polares (0,87%), oosfera/núcleo central (5,21%) e embrião/núcleo central (5,56%). Neste estágio de desenvolvimento a proporção de embrião/endosperma é bastante elevada (82,45%).

A porcentagem de sacos-embrionários abortados foi maior na fase de pré-antese (10,12%) diminuindo para 5,82% na fase de antese.





Figura 7. *Eupatorium pauciflorum* H.B.K.

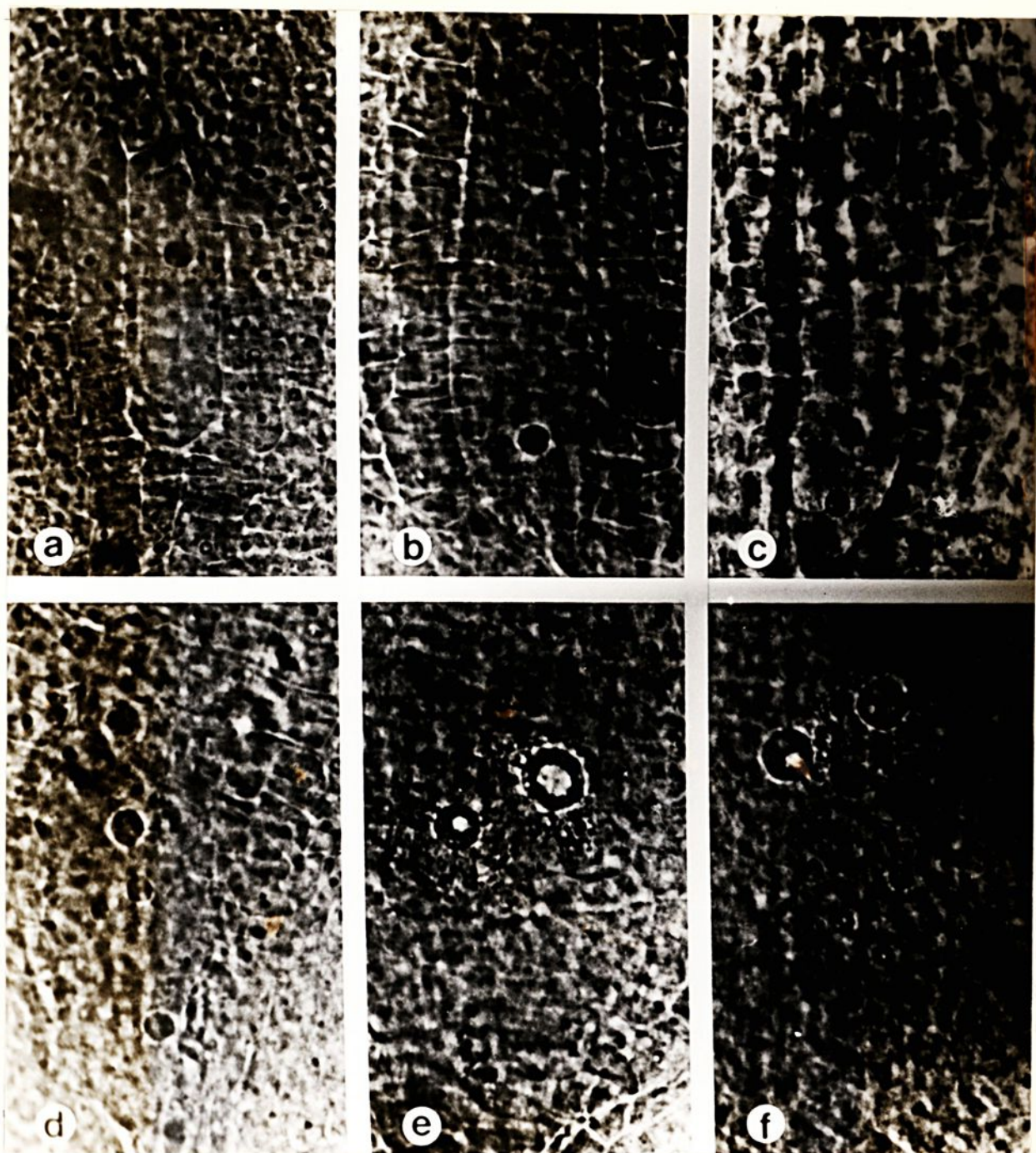


Figura 8. Formação do saco-embriônico em *E. pauciflorum*. a. megasporócito; b. Saco-embriônico binucleado; c. Saco-embriônico tetranucleado; d. Saco-embriônico com oosfera e dois núcleos polares; e. Saco-embriônico com oosfera e núcleo central; f. Saco-embriônico com iniciação do embrião e endosperma. a,b,c,d,e e f, 925x.

Tabela 12. Conteúdo de óvulos de *E. pauciflorum* em diferentes estágios de desenvolvimento floral. Os dados são expressos em porcentagem dos óvulos examinados antes do início da antese, não se incluindo aqueles abortados, portanto, a ausência de megasporócitos e sacos embrionários subsequentes. Essa tabela apresenta os dados de 1938 a 1949.

Conteúdo	Estágio Floral		
	Fase Inicial	Pré-Antese	Antese
Plantas examinadas	05	05	05
Óvulos examinados	1938	672	1151
Saco-embrionário abortado	173 8,93%	68 10,12%	67 5,82%
Megasporócito	162 8,36%	0	0
Saco-embrionário 2-nucleado	176 9,08%	1 0,15%	0
Saco-embrionário 4-nucleado	148 7,64%	4 0,60%	1 0,09%
Oosfera e núcleos polares	606 31,27%	31 4,61%	10 0,87%
Oosfera e núcleo central	541 27,91%	192 28,57%	60 5,21%
Embrião e núcleo central	59 3,04%	91 13,54%	64 5,56%
Embrião e endosperma	73 3,77%	285 42,41%	949 82,45%

2.2 Microsporogênese:

A análise da microsporogênese em *E. pauciflorum* demonstra ocorrer completa degeneração dos microsporócitos antes do início da meiose não se podendo verificar, portanto, a presença de microsporócitos e fases subsequentes. Essas observações indicam que não ocorre a formação de grãos-de-pólen no material estudado, apresentando, deste modo, plena esterilidade masculina.

2.3 Cariótipo:

A análise do cariótipo em *E. pauciflorum* foi realizada em uma única célula, representando uma plântula, devido à dificuldade em se obter boas células em consequência do reduzido tamanho dos cromossomos. A figura 9a apresenta esta célula. As medidas cromossômicas incluindo braços longo e curto, comprimento total dos braços, proporção dos braços e comprimento relativo em relação ao comprimento total do complemento cromossômico estão apresentadas na tabela 13. Com base nestas 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. A figura 9b apresenta o complemento cromossômico da célula analisada, em metáfase, com os cromossomos presumivelmente homólogos, agrupados. Nesta célula não foi possível observar a presença de satélites.

A tabela 14 caracteriza o genoma da espécie estudada e foi baseado nas médias de valores obtidos da análise da célula analisada. Os valores de cada cromossomo desta tabela baseiam-se em 3 cromossomos considerados equivalentes. O braço longo variou de $0,67\mu\text{m}$ (cromossomo 10) a $1,07\mu\text{m}$ (cromossomo 2); o braço curto, de $0,40\mu\text{m}$ (cromossomo 10) a $0,71\mu\text{m}$ (cromossomo 3) e o comprimento total dos cromossomos variou de $1,07\mu\text{m}$ (cromossomo 10) a $1,74\mu\text{m}$ (cromossomo 2). Quanto à proporção entre os braços, os valores extremos foram 1,19 (cromossomo 6) a 2,19 (cromossomo 4) e, para a proporção do comprimento total do genoma, os extremos foram 7,50 (cromossomo 10) a 12,20 (cromossomo 2).



Na tabela 13, a ordem dos cromossomos foi feita com base no comprimento. No entanto, a proporção cromossômica também foi utilizada no processo de reconhecer cromossomos equivalentes da célula analisada visando a caracterização do genoma.

Quanto ao tamanho, todos os cromossomos são considerados pequenos, medindo entre $1,07\mu\text{m}$ e $1,74\mu\text{m}$. O comprimento total do genoma é de $14,26\mu\text{m}$. DYER (1979) afirmou, no entanto, que o estudo da morfologia só é possível se o comprimento cromossômico exceder $2\mu\text{m}$.

Quanto à posição do centrômero todos os cromossomos são submetacêntricos. O cromossomo mais próximo de ser metacêntrico é o cromossomo 6, com a proporção de braços de 1,19 e o cromossomo mais próximo de ser acrocêntrico é o cromossomo 4, com a proporção de braços de 2,19. Os cromossomos nesta espécie são difíceis de serem identificados em consequência da pequena diferenciação morfológica, como indica o cariótipo e o idiograma do genoma apresentados nas figuras 9b e 9c, respectivamente. Os satélites não são visíveis no grau de condensação cromossômica mais favorável para a realização das medidas.



c

Figura 9. Cromossomos de *F. pusillus*. a. Célula mitótica em metáfase, mostrando os cromossomos; b. Cariótipo; c. Idiograma. a e b, escala represent. 5 μm .

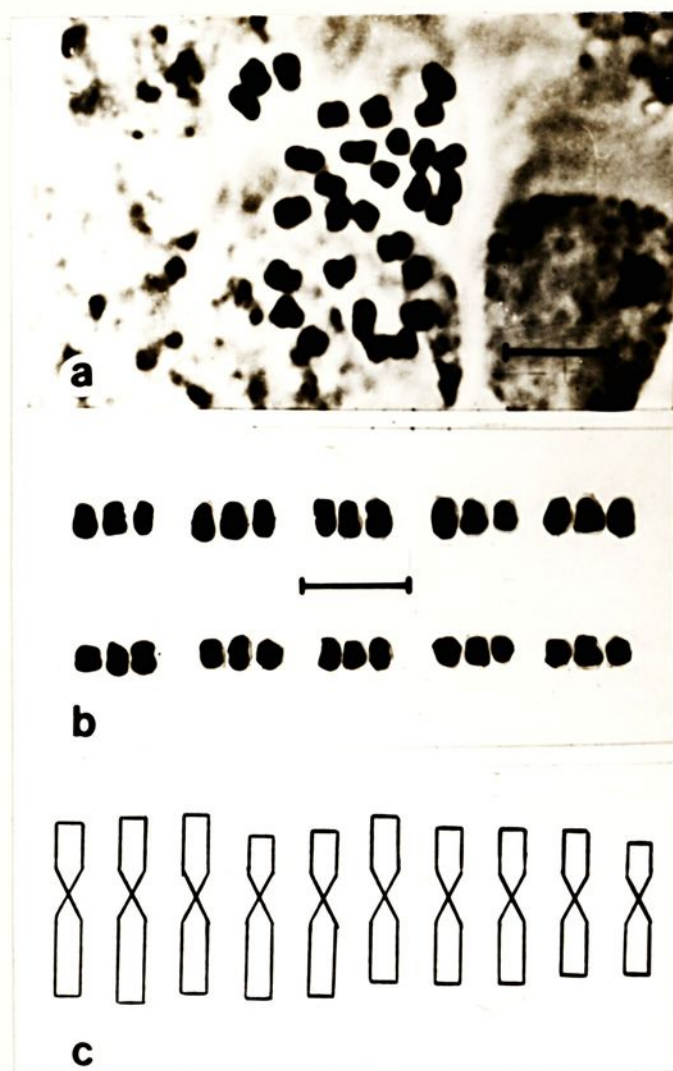


Figura 9. Cromossomos mitóticos em *E. pauciflorum*. a. Célula mitótica em metáfase mostrando 30 cromossomos; b. Cariótipo; c. Idiograma. a e b, escala representa 5 μ m.

Tabela 13. Medidas (μm) de cromossomos (a,b,c) dos 10 grupos cromossômicos considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 1 de *E. pauciflorum* (Comprimento total do complemento: 42,80 μm)

=====					
Grupo	Braço cromossômico		Comprimento total	Proporção de braços	Comprimento relativo
	(L)	(C)	(L+C)	(L/C)	%

1 a	1,20	0,67	1,87	1,79	4,37
b	0,93	0,53	1,46	1,75	3,41
c	0,93	0,53	1,46	1,75	3,41
2 a	1,07	0,67	1,74	1,60	4,07
b	1,07	0,67	1,74	1,60	4,07
c	1,07	0,67	1,74	1,60	4,07
3 a	0,93	0,80	1,73	1,16	4,04
b	0,93	0,67	1,60	1,39	3,74
c	0,93	0,67	1,60	1,39	3,74
4 a	1,20	0,53	1,73	2,25	4,04
b	0,93	0,40	1,33	2,33	3,11
c	0,80	0,40	1,20	2,00	2,80
5 a	0,93	0,53	1,46	1,75	3,41
b	0,93	0,53	1,46	1,75	3,41
c	0,93	0,53	1,46	1,75	3,41
6 a	0,80	0,67	1,47	1,19	3,43
b	0,80	0,67	1,47	1,19	3,43
c	0,80	0,67	1,47	1,19	3,43
7 a	0,80	0,53	1,33	1,51	3,11
b	0,80	0,53	1,33	1,51	3,11
c	0,80	0,53	1,33	1,51	3,11
8 a	0,80	0,53	1,33	1,51	3,11
b	0,80	0,53	1,33	1,51	3,11
c	0,80	0,53	1,33	1,51	3,11
9 a	0,67	0,67	1,34	1,00	3,13
b	0,67	0,53	1,20	1,26	2,80
c	0,67	0,40	1,07	1,68	2,50
10a	0,67	0,40	1,07	1,68	2,50
b	0,67	0,40	1,07	1,68	2,50
c	0,67	0,40	1,07	1,68	2,50
=====					

Tabela 14. Médias ($\bar{X} \pm S\bar{X}$, em μm) dos braços longo (L) e curto (C) de 3 cromossomos da célula 1 de *E. pauciflorum*. Comprimento total médio do genoma: $14,26\mu\text{m}$.

Cromossomo	L	C	L+C	L/C	L+C/ 14,26
1	$1,02 \pm 0,09$	$0,58 \pm 0,05$	$1,60 \pm 0,14$	1,76	11,22
2	$1,07 \pm 0$	$0,67 \pm 0$	$1,74 \pm 0$	1,60	12,20
3	$0,93 \pm 0$	$0,71 \pm 0,04$	$1,64 \pm 0,04$	1,31	11,50
4	$0,98 \pm 0,12$	$0,44 \pm 0,04$	$1,42 \pm 0,16$	2,19	9,96
5	$0,93 \pm 0$	$0,53 \pm 0$	$1,46 \pm 0$	1,75	10,24
6	$0,80 \pm 0$	$0,67 \pm 0$	$1,47 \pm 0$	1,19	10,31
7	$0,80 \pm 0$	$0,53 \pm 0$	$1,33 \pm 0$	1,51	9,33
8	$0,80 \pm 0$	$0,53 \pm 0$	$1,33 \pm 0$	1,51	9,33
9	$0,68 \pm 0$	$0,53 \pm 0,08$	$1,20 \pm 0,08$	1,31	8,41
10	$0,67 \pm 0$	$0,40 \pm 0$	$1,07 \pm 0$	1,68	7,50

2.4 Ocorrência de polinização:

Estudos complementares de contagem do número de grãos-de-pólen sobre estigmas, em *Eupatorium pauciflorum*, apontam um número muito reduzido de grãos-de-pólen no estigma. Foram estudadas 5 plantas, num total de 125 pistilos examinados, sendo que, apenas 2 (1,6%) dos pistilos analisados apresentaram grãos-de-pólen, numa média de 0,01 grãos por pistilo, conforme indicado na tabela 15. Estes resultados indicam que não ocorreu fertilização e, provavelmente, estes grãos são provenientes de outras espécies, já que a análise da microsporogênese, nesta espécie, não demonstrou a formação de grãos-de-pólen.

2.5 Germinabilidade e produção de sementes:

Os resultados dos testes de germinação de sementes retiradas de 10 plantas revelaram porcentagens variando de 2% (1 semente) a 8% (4 sementes), no germinador. Das 500 sementes testadas, apenas 25 (5%) germinaram, como indicado na tabela 16.

À temperatura ambiente o número de sementes que germinaram foi maior. A partir de 10 plantas, 500 sementes foram testadas, sendo que destas, 167 (33,4%) germinaram, revelando porcentagens de germinação que variaram de 10% (5 sementes) a 54% (27 sementes), como indicado na tabela 17. Dentro dos objetivos deste trabalho não foi considerado definir os fatores envolvidos na germinação, embora incompatibilidade de sementes, dormência, degeneração do endosperma, diferenças genéticas, entre outras, possam impedir a germinação, embora tenha sido constatada a presença de embrião nas sementes semeadas. Provavelmente, os fatores temperatura e umidade foram os responsáveis pela variação observada na porcentagem de germinação à temperatura ambiente e no germinador. No ambiente, os índices temperatura e umidade são menores e variáveis enquanto, no germinador, estes fatores são mais elevados e constantes.

Estudos complementares para verificar a produção de sementes contendo embriões, foram realizados em 10 plantas de *Eupatorium pauciflorum*, num total de 1650 ovários examinados, das quais 1399 (84,8%) produziram sementes (tabela 18).



Tabela 15. Ocorrência de grãos-de-pólen em estigmas de *Eupatorium pauciflorum*.Tabela 15. Ocorrência de grãos-de-pólen em estigmas de *Eupatorium pauciflorum*.

Nº da planta	Nº de pistilos examinados	Pistilos com grãos		Grãos por pistilo	
		Nº	%	Variação	Média
1	25	0	0	0	0
2	25	0	0	0	0
3	25	0	0	0	0
4	25	2	8	1	0,08
5	25	0	0	0	0
Total	125	2	1,6	1	0,01

Tabela 16. Germinabilidade de *Eupatorium pauciflorum* no germinador , ao longo de 50 dias (50 sementes por planta).

Planta	Sementes germinadas	
	Número n=50	%
1	1	2
2	4	8
3	3	6
4	1	2
5	3	6
6	2	4
7	3	6
8	3	6
9	2	4
10	3	6
Total	25	50

Tabela 17. Germinabilidade de *Eupatorium pauciflorum* à temperatura ambiente, ao longo de 82 dias (50 sementes por planta).

Planta	Sementes germinadas	
	Número n=50	%
1	15	30
2	23	46
3	27	54
4	05	10
5	07	14
6	11	22
7	21	42
8	23	46
9	10	20
10	25	50
Total	167	33,4

IV. DISCUSSÃO

Tabela 18. Produção de sementes em *Eupatorium pauciflorum*.

Planta	Total de ovários examinados	Sementes produzidas	
		Nº	%
1	173	141	81,5
2	145	135	93,1
3	180	155	86,1
4	155	138	89,0
5	140	122	87,1
6	179	146	81,6
7	175	149	85,1
8	181	151	83,4
9	135	117	86,7
10	187	145	77,5
Total	1650	1399	84,8

IV. DISCUSSÃO

A família Compositae é uma das maiores famílias entre as Angiospermas e ao menos 15% de seus gêneros têm sido investigados embriologicamente. Na maioria das espécies, uma única célula arquesporial funciona como célula-mãe-de-megásporos, sendo que citocinese nesta célula acompanha meiose e o megásporo chalazal da tétrade desenvolve-se num saco-embriológico do tipo Polygonum. Em adição à formação de sacos-embriológicos reduzidos, apomixia é comum e resulta no desenvolvimento de sacos-embriológicos não reduzidos, com oosferas que podem se desenvolver partenogeneticamente. Os três principais tipos de apomixia podem ser encontrados nas Compositae: embrionia adventícia, aposporia e diplosporia (DAVIS, 1966).

Na espécie estudada, *Eupatorium pauciflorum*, a ocorrência regular de embriões em óvulos de flores já nas fases iniciais de desenvolvimento (tabela 12) e, portanto, impossibilitadas de terem sido polinizadas, é um forte indício de apomixia. O fato de não ter sido observado, em nenhum óvulo examinado, a formação de saco-embriológico a partir de uma célula somática do tipo apospórico ou de início de embriões, diretamente, a partir de células somáticas do tipo embrionia adventícia, eliminou-se a possibilidade de ser a apomixia, em *E. pauciflorum*, um destes tipos. Além disso, nenhum óvulo mostrou a presença de díades e tétrades de megásporos o que sugere ausência ou modificação da meiose na megasporogênese. A constatação de que o saco-embriológico maduro resulta de 3 divisões sucessivas do núcleo do megasporócito, que funciona como megásporo (figuras 8a a 8c), concluiu-se que o tipo de apomixia em questão é a diplosporia, o que está de acordo com a afirmação de RICHARDS (1986), em que as Compositae apresentam uma pré-disposição à diplosporia.

O tipo de diplosporia em *Eupatorium pauciflorum* 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. Também não foi observada



separação por uma parede celular dos dois núcleos iniciais, característico do tipo *Taraxacum*.

Segundo a classificação sugerida por WILLESEN & NAUMOVA (1992) para o desenvolvimento do gametófito feminino, se a espécie for apomítica várias modificações ocorrem durante os estágios de diferenciação: se a espécie for diplospórica, como *Eupatorium pauciflorum*, os estágios de planejamento e transição são normais, porém durante o estágio de seleção, as divisões meióticas no megasporócito podem mostrar uma deficiência do transporte ou divisão de cromossomos, ou ainda, as divisões podem ser mitóticas e não meióticas.

Os resultados obtidos na análise do desenvolvimento do saco-embriônico em diferentes estágios de desenvolvimento floral, em *Eupatorium intermedium*, revelam a ocorrência regular de meiose, indicada através da presença de díades e tétrades de megásporos (0,69% e 6,43%, respectivamente, como podemos ver na tabela 1). Um estudo realizado por COLEMAN (1991) em uma outra espécie sexuada, *E. inulaefolium*, apresentou resultados semelhantes aos encontrados em *E. intermedium*. O autor também encontrou, nas fases iniciais de desenvolvimento, a presença de díades e tétrades de megásporos (1,49% e 19,34%, respectivamente). A baixa frequência de díades e tétrades de megásporos, em *E. intermedium*, pode ser explicada pelo fato de que estas duas fases têm curta duração e assim, dificilmente, encontramos óvulos nestes estágios de desenvolvimento.

Nas duas espécies, *E. intermedium* e *E. inulaefolium*, foi observada a ocorrência de embrião e endosperma apenas em óvulos de flores já abertas, o que indica que polinização e fertilização da oosfera e o núcleo central são processos necessários para o desenvolvimento do embrião e endosperma. A baixa frequência de embrião e núcleo central, nas duas espécies, (0,72% em *E. intermedium* e 1,22% em *E. inulaefolium*) indica que embrião e endosperma começam a se dividir quase que simultaneamente. A iniciação do endosperma, nestas espécies, se dá através da união do núcleo central com um dos núcleos masculinos. Em *E. intermedium*, como o núcleo central é diplóide,



o endosperma originado será, necessariamente, $3n=60$.

A semelhança de resultados obtidos em *E. intermedium* e *E. inulaefolium*, também diz respeito à microsporogênese, que apresenta, nas duas espécies, ocorrência normal de todas as fases da microsporogênese e formação de pólen, revelando alta fertilidade masculina para o material examinado, o que está de acordo com a natureza sexuada das duas espécies. Além destes fatores, a determinação da ocorrência de pólen sobre estigmas, nas duas espécies, aponta uma frequência alta de estigmas contendo grãos-de-pólen (74,4% em *E. intermedium*, tabela 9, e 71,2% em *E. inulaefolium*), o que indica a ocorrência regular de polinização com grãos-de-pólen viáveis.

Em *Eupatorium pauciflorum* a presença de endosperma em óvulos em fases iniciais de desenvolvimento (tabela 12) indica que sua formação é do tipo autônoma, ou seja, completamente independente do processo de polinização e fertilização do núcleo central. O desenvolvimento autônomo do endosperma ocorre na maioria das espécies apomíticas da família Compositae, enquanto em outras famílias é uma condição esporádica.

A iniciação autônoma do endosperma pode ser a partir de núcleos polares livres ou a partir do núcleo central. As observações embriológicas de *Eupatorium pauciflorum* demonstraram que os dois núcleos polares se unem e que o endosperma têm início a partir do núcleo central resultante (tabela 12, figura 8). Como os núcleos polares são diplóides com $2n=30$, o endosperma originado da união daqueles núcleos será, necessariamente, tetraplóide com $4n=6x=60$.

Nas espécies sexuadas e em muitas, 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 pauciflorum*, aqui estudada, *E. squalidum* (COLEMAN & COLEMAN, 1988) e *E. glandulosum* (HOLMGREN, 1919). Segundo VIJAYARAGHAVAN & PRABHAKAR (1984) isto é de interesse fisiológico pois fornece evidências irrefutáveis



para suportar a posição que desenvolvimento precoce do embrião não é mantido por nutrientes do endosperma mas sim, por nutrientes transferidos para o saco-embriônico a partir de tecidos próximos.

No caso de embrionia precoce, isto é, a formação de embrião ainda em fase de botão, nas espécies pseudogâmicas, a formação do endosperma é, necessariamente, retardada até a antese para fecundação dos núcleos polares. Entretanto, nas espécies autônomas, a formação de ambos, embrião e endosperma, pode ser iniciada ainda na fase de botão, como o que ocorre em *E. pauciflorum*. A embrionia precoce com o desenvolvimento do embrião ainda na fase de botão, em *Eupatorium pauciflorum*, elimina a possibilidade da sua formação através de fecundação.

No caso de *Eupatorium pauciflorum* apenas cerca de 30% dos óvulos em fase de pré-floração apresentavam ainda oosferas (tabela 12). Considerando que uma grande parte dos óvulos examinados em fases iniciais de desenvolvimento e pré-floração foram coletados várias horas antes da antese, a porcentagem de óvulos apresentando oosferas no momento exato da antese teria sido, consideravelmente, menor. As observações realizadas durante a fase de antese mostraram a presença de oosferas em apenas 6% dos óvulos examinados (tabela 12). Estes resultados demonstram que, na espécie *Eupatorium pauciflorum*, a embrionia precoce representa uma barreira quase absoluta à reprodução sexuada. Esta conclusão é apoiada pelo fato de que nenhum dos 3761 óvulos examinados nas fases iniciais de desenvolvimento, pré-antese e antese acusaram a presença de tubo polínico, embora 1521 (41%) apresentassem embrião. Portanto, a prevalência da embrionia precoce e a ausência de tubos polínicos indicam ser a reprodução do material examinado de *Eupatorium pauciflorum*, exclusivamente, apomítica.

De acordo com GUSTAFSSON (1947) podemos assumir que espécies diplospóricas, autônomas são caracterizadas pela assindese, principalmente, masculina. As espécies pseudogâmicas não apresentam muitas anormalidades meióticas, já que a produção de sementes depende da presença de pólen viável. Em algumas



espécies a formação de grãos-de-pólen não ocorre. Em *Crepis acuminata*, por exemplo, as células-mãe-de-micrósporos parecem normais nos estágios iniciais de paquíteno quando então, degeneram. Nas plantas apomíticas autônomas vários graus de degeneração na meiose masculina são observados. A degeneração do pólen pode ser dirigida para que as células-mãe-de-micrósporos não se formem ou que se desintegram antes do início da divisão, o que foi encontrado no material estudado de *E. pauciflorum*.

Eupatorium pauciflorum é uma espécie triplóide cuja análise da microsporogênese revelou a ausência de microsporócitos e de toda a sequência de fases observáveis durante a formação de grãos-de-pólen demonstrando ocorrer completa degeneração dos microsporócitos antes do início da meiose, indicando completa esterilidade masculina no material examinado. Em *E. pauciflorum* esterilidade masculina está associada a poliploidia e agamospermia, o que nos leva a supor que, reprodução apomítica permite a persistência destas características.

A análise do pareamento cromossômico durante a diacinese e metáfase, em *Eupatorium intermedium*, revelou a ocorrência uniforme de 10 bivalentes, sendo que, todos os aspectos da microsporogênese e formação do pólen foram normais. A regularidade da microsporogênese e formação do pólen indica um alto grau de fertilidade masculina para o material estudado, o que está de acordo com sua natureza sexuada.

Os estudos do cariótipo em *Eupatorium pauciflorum* indicam a presença de três genomas morfologicamente semelhantes no complemento caracterizando assim, a espécie como autotriplóide (tabelas 13 e 14, figura 7). O cariótipo pode ser classificado como sendo homogêneo e simétrico, sendo que, cariótipos simétricos são considerados primitivos dentro de um grupo taxonômico em relação a cariótipos assimétricos.

Em *Eupatorium intermedium* os estudos de cariótipo indicam a presença no complemento de dois genomas, caracterizando a espécie como diplóide (tabelas 2 a 8, figura 6). Nesta espécie notamos a presença de dois cromossomos SAT e o cariótipo pode ser classificado como homogêneo e simétrico.



Segundo STEBBINS (1971) e GRANT (1975) um cariótipo simétrico é aquele em que os cromossomos são todos, aproximadamente, do mesmo tamanho e apresentam centrômeros medianos ou submedianos. O aumento da assimetria, ou seja, uma variação maior no tamanho dos cromossomos pode ocorrer através de uma alteração na posição do centrômero de mediano para subterminal ou terminal ou através do acúmulo de diferenças no tamanho relativo entre os cromossomos do complemento, tornando o cariótipo mais heterogêneo.

O presente estudo leva à conclusão de que *Eupatorium intermedium* é uma espécie sexuada enquanto *E. pauciflorum*, apomítica. As evidências que suportam esta conclusão em *E. pauciflorum* são:

- a. Não ocorrência de meiose reducional durante a megasporogênese;
- b. Formação precoce de embrião e endosperma;
- c. Completa esterilidade masculina;
- d. Ausência de polinização;
- e. Natureza triplóide da espécie.

Atualmente, os complexos agâmicos incluem alguns dos grupos de plantas mais bem sucedidas, colonizando áreas continentais grandes e diversificadas com condições climáticas, muitas vezes, desfavoráveis. Apomixia confere várias vantagens às plantas caracterizadas por este sistema genético: possibilita reprodução no caso de híbridos sexualmente estéreis, bem como nas plantas poliplóides ímpares; fixa a heterose, permitindo a perpetuação de genótipos heterozigotos bem adaptados que seriam desfeitos pela reprodução sexuada; assegura reprodução mesmo na ausência de polinizadores, nas espécies apomíticas autônomas, o que pode ser vantajoso em condições climáticas extremas e em regiões com poucos polinizadores. Apomixia apresenta vantagem sobre reprodução sexuada e, invariavelmente, resulta na formação de sementes que constitui um sistema eficaz de disseminação do biótipo.

Em resumo, apomixia representada pela agamospermia facultativa, pode ser considerada um sistema genético quase ideal, pois possibilita a replicação fiel de biótipos



heterogenéticos bem adaptados, enquanto baixos níveis de reprodução sexuada gera novos biótipos que serão expostos às forças de seleção natural (ORNDUFF, 1969, 1971; DE WET & STALKER, 1974).

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

Em estudos realizados com *E. intermedium* e *E. muricatum*, foi observado que a reprodução sexuada é mais frequente em populações de baixa densidade.

V. RESUMO

Este estudo teve por objetivo investigar o modo de reprodução de duas espécies do gênero *Eupatorium*: *E. intermedium* D.C. e *E. pauciflorum* H.B.K. (Compositae), e foi constituído das seguintes abordagens:

- a. Desenvolvimento do gametófito feminino;
- b. Estudo da Microsporogênese e formação de grãos-de-pólen;
- c. Estudo do Cariótipo;
- d. Verificação da ocorrência de polinização;
- e. Determinação da germinabilidade e produção de sementes.

O material de estudo de *E. intermedium* foi coletado de 5 plantas de população natural do Parque do Estado de São Paulo, SP e fixado em FAA. Os estudos embriológicos foram realizados utilizando-se o método de clarificação de óvulos.

A análise do conteúdo de óvulos clarificados revelou a presença de díades e tétrades de megásporos, cujas frequências indicam que meiose redutiva é característica regular da megasporogênese. O megásporo da região chalazal aumenta de tamanho e sofre 3 divisões mitóticas sucessivas originando o saco-embrionário maduro, com 8 núcleos, do tipo Polygonum. A formação do embrião precede a do endosperma que origina-se a partir da fusão de um núcleo masculino e o núcleo central, formado a partir da união dos dois núcleos polares. A análise do conteúdo de 878 óvulos em fases iniciais de desenvolvimento e em pré-antese (botões dentro de 24 horas antes de alcançar a antese) revelou a ausência de formação de embrião e endosperma, que somente ocorre em óvulos em fase de antese, quando os estigmas estão expostos, possibilitando a ocorrência de fertilização. A espécie *E. intermedium* é demonstrada ser, portanto, estritamente sexuada.

A análise da microsporogênese foi realizada através da técnica de esmagamento de anteras, utilizando-se botões florais fixados em etanol absoluto e ácido-acético (3:1) e coradas em carmim acético. Cromossomos em paquíteno apresentam-se estendidos sendo que a normalidade de pareamento é bastante evidente em



diacinese podendo-se observar a presença de 10 bivalentes, levando à produção normal de tétrades de micrósporos cujos núcleos sofrem mitose originando os grãos-de-pólen que são liberados na condição trinucleada. A regularidade da microsporogênese e formação de pólen indicam um alto grau de fertilidade masculina para o material estudado.

Os estudos de cariótipo em *E. intermedium* foram baseados na análise de seis células de pontas de raízes fixadas em etanol absoluto e ácido-acético (3:1), pré-tratadas com oxiquinoleína (0,002 M) e coradas com carmim acético. Quanto ao tamanho, os cromossomos medem 2,66µm a 4,07µm sendo considerados submetacêntricos. Medidas dos braços longo (L), braço curto (C), comprimento total (L+C) e proporção de braços (L/C) permitiram o reconhecimento de dois genomas idênticos no complemento o que indica ser *E. intermedium* uma espécie diplóide $2n=2x=20$.

Estudos complementares de contagem do número de grãos-de-pólen sobre estigmas revelam que, a partir de 90 pistilos examinados, 74,4% apresentam grãos-de-pólen, numa média de 4,4 grãos por pistilo.

Os resultados dos testes de germinação de sementes demonstraram que, ao final de 21 dias, 69,3% das sementes haviam germinado. A produção de sementes contendo embriões foi analisada em 7 plantas, num total de 1730 ovários examinados, destes, apenas 2,8% produziram sementes.

O material de estudo de megasporogênese e desenvolvimento do saco-embriológico em *E. pauciflorum* foi coletado de populações naturais na região de São José do Rio Preto, SP, e fixado em FAA. A ausência de formação de díades e tétrades de megásporos nos óvulos analisados indica a ausência de meiose reductiva. O megasporócito funciona diretamente como megásporo e seu núcleo sofre 3 divisões dando origem a um saco-embriológico com 8 núcleos, do tipo Polygonum. O início da formação do embrião a partir da oosfera precede a formação do endosperma, sendo que os dois núcleos polares, invariavelmente, se fundem formando o núcleo central que dará origem ao endosperma.



VI. **DISCUSSÃO** A análise do conteúdo de 2610 óvulos em fases iniciais de desenvolvimento e em pré-antese revelou que, aproximadamente, 20% já continham embriões. A constatação de embriões precoce representa uma evidência bastante forte de apomixia em *E. pauciflorum*. Dois fatores indicam ser a diplosporia o tipo de apomixia envolvido: a divisão não-redutiva do núcleo do megasporócito e a ausência de células apospóricas. O desenvolvimento do endosperma é autônomo, ou seja, não requer fertilização do núcleo central.

VII. **CONCLUSÃO** A análise da microsporogênese demonstra ocorrer completa degeneração dos microsporócitos antes do início da meiose indicando, deste modo, um alto grau de esterilidade masculina para o material examinado.

VIII. **RESUMO** Os estudos do cariótipo em *E. pauciflorum* foram baseados na análise de uma célula de ponta de raiz fixada, pré-tratada e corada como em *E. intermedium*. Quanto ao tamanho todos os cromossomos são considerados pequenos, medindo de 1,07um a 1,74um, sendo submetacêntricos. Medidas do braço longo (L), braço curto (C), comprimento total (L+C) e proporção dos braços (L/C), permitiram o reconhecimento de 3 genomas idênticos no complemento o que indica ser *E. pauciflorum* uma espécie autotriplóide $2n=3x=30$.

IX. **STUDIOS COMPLEMENTARES** Estudos complementares de contagem do número de grãos-de-pólen sobre 125 estigmas revelam que apenas 1,6% apresentaram grãos-de-pólen.

X. **RESULTADOS** Os resultados dos testes de germinação de sementes de 10 plantas revelaram que à temperatura ambiente o número de sementes que germinaram foi maior (33,4%) quando comparadas àquelas colocadas no germinador a 30°C (5%). A produção de sementes contendo embriões foi analisada em 10 plantas, num total de 1650 ovários examinados, sendo que destes 84,8% produziram sementes.

XI. **CONCLUSÃO** Conclui-se com base no material estudado que *E. intermedium* é espécie diplóide, estritamente sexuada, enquanto *E. pauciflorum* é triplóide e apomítica, diplospórica.



VI. SUMMARY

The objective of this study was to investigate the reproduction of two species of the genus *Eupatorium*: *E. intermedium* D.C. e *E. pauciflorum* H.B.K. (Compositae) The study included the following approaches:

- a. Embryological studies;
- b. Study of microsporogenesis and pollen grain formation;
- c. Determination of the karyotype;
- d. Verification of the occurrence of pollination;
- e. Determination of seed production and germinability.

The embryological studies of *E. intermedium* were based on material collected from 5 plants of a natural population which occurs in the Parque do Estado de São Paulo, SP. Ovules were fixed in FAA and studied by the method of clarification.

The analysis of clarified ovules revealed the presence of dyads and tetrads of megaspores in frequencies which indicate that reductional meiosis is a regular feature of megasporogenesis. The megaspore of the chalazal region increases and undergoes three successive mitotic divisions to give raise to the mature 8-nucleate embryo-sac of the Polygonum type. Embryo formation precedes endosperm formation which originates from the fusion of a male nucleus and the central nucleus, which in turn originated from the fusion of the two polar nuclei. The analysis of 878 ovules in initial stages of development and in pre-anthesis (buds estimated to be within 24 hours of achieving anthesis, but still closed) revealed the absence of embryo and endosperm formation which only occurred in anthesis after the stigmas were exposed. These observations indicate *E. intermedium* to be strictly sexual.

The analysis of microsporogenesis was done using the smear technique of anthers from buds fixed in absolute ethanol: acetic acid (3:1) and stained in aceto-carmin. Paquitene chromosomes were normally extended and the normality of pairing was evident in later stages of prophase. The regular occurrence of 10 bivalents leads to the normal production of tetrads of



microspores, the nucleus of which undergoes two mitotic divisions to produce pollen grains which are three nucleate when released. The regularity of microsporogenesis and pollen formation indicate a high degree of male fertility in the material studied.

Karyotypic studies used root tips fixed in absolute ethanol:acetic acid (3:1), pretreated with oxyquinoline (0,002 M) and stained with aceto-carmin. Six cells of *E. intermedium* were analyzed. Metaphase chromosomes were determined to measure from 2,66 μ m to 4,07 μ m and were all submetacentric. Measurements of long arm, short arm and total length, as well as the determination of arm ratio, permitted the recognition of a complement composed of two identical genomes, thereby indicating *E. intermedium* to be diploid, $2n=2x=20$.

Counts of the number of pollen grains occurring on stigmas revealed that of 90 pistils examined, 74,4% had at least one grain and a mean of 4,4 grains.

The results of germination tests revealed that after 21 days 68,3% of seeds had germinated. Seed production was determined in 7 plants and showed that of 1730 ovaries examined only 2,8% produced seeds.

Material for the study of *Eupatorium pauciflorum* was collected from natural populations occurring in São José do Rio Preto, SP. The embryological studies showed the complete absence of dyads and tetrads of megaspores which indicates that reductive meiosis does not occur in the material studied. The megasporocyte functions directly as the megaspore, its nucleus undergoing three mitotic divisions to form an 8-nucleate embryo sac of the Polygonum type. Embryo formation precedes endosperm formation. The two polar nuclei invariably fuse and the endosperm originates from the resulting central nucleus.

An analysis of 2610 ovules from buds in the initial stages of development and pre-anthesis revealed that approximately 20% of the ovules already contained embryos. The comprovation of precocious embryony is strong evidence for the existence of apomixia in *E. pauciflorum*. Two factors indicate that diplospory is the type of apomixis involved: the non-



reductive division of the megasporocyte and the absence of aposporic cells. Endosperm development is autonomous, i. e., fertilization of the central nucleus does not occur.

The generative tissue of the anthers completely degenerates before meiosis of microsporogenesis is initiated and results in total masculine sterility.

Karyotype analysis in *E. pauciflorum* was based on a single root tip cell. The chromosomes are very small, varying from 1,07 μ m to 1,74 μ m, and submetacentric. Long arm, short arm and total lengths, as well as arm ratios, permitted the recognition of three identical genomes in the complement, which indicates *E. pauciflorum* to be autotriploid, $2n=3x=30$.

The determination of the number of pollen grains on 125 stigmas of *E. pauciflorum* revealed that only 1,6% presented grains.

Germination tests involving seeds collected from 10 plants showed higher germination rates at room temperature (33,4%) than in a germinator at 30°C (5%). Seed production was determined in 10 plants and of a total of 1650 ovaries examined 84,8% produced seeds.

On the basis of these studies it is concluded that *Eupatorium intermedium* is a diploid, strictly sexual species and that *E. pauciflorum* is triploid and apomictic.

VII. BIBLIOGRAFIA:

- AKERBERG, E. Apomictic and sexual seed formation in *Poa pratensis*. *Hereditas*, v.25, p.359-370, 1937.
- AKERBERG, E. Cytogenetic studies in *Poa pratensis* and its hybrid with *Poa alpina*. *Hereditas*, v.28, p.1-126, 1942.
- ALEXOPOULOS, C. J., BENKE, E. S. *Laboratory Manual for Introductory Mycology*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1952. 250p.
- ASKER, S. Apomixis and sexuality in the *Potentilla argentea* complex. I. Crosses with other species. *Hereditas*, v.66, p.127-144, 1970a.
- ASKER, S. Apomixis and sexuality in the *Potentilla argentea* complex. II. Crosses within the complex. *Hereditas*, v.66, p.189-204, 1970b.
- ASKER, S. Apomixis and sexuality in the *Potentilla argentea* complex. III. Euploid and aneuploid derivatives of soft apomictic biotypes. *Hereditas*, v.67, p.111-142, 1971.
- ASKER, S. Pseudogamy, hybridization and evolution in *Potentilla*. *Hereditas*, v.87, p.179-184, 1977.
- ASKER, S. Progress in apomixis research. *Hereditas*, v.91, p.231-240, 1979.
- ASKER, S. Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation. *Hereditas*, v.93, p.277-293, 1980.
- ASKER, S. Apomixis and biosystematics. In: *Plant Biosystematics*. Academic Press Canada, 1984. p.237-248.
- BAKER, J. G. Compositae. In: Martius, *Flora Brasiliensis* 6. 1884.
- BARA, I. I. Reproduction - a factor of plant evolution. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, v.58, p.127-137, 1989.
- BASHAW, E. C., HIGHLIGHT, K. W. Gene transfer in apomictic buffelgrass through fertilization of an unreduced egg. *Crop Sci.*, v.30, p.571-575, 1990.
- BAYER, R. J., CRAWFORD, D. J. Allozyme divergence among five diploid species of *Antennaria* and their allopolyploid derivatives. *American Journal of Botany*, v.68, p.1342-1349,



1986.

- BAYER, R. J. Patterns of isozyme variation in the *Antennaria rosea* polyploid agamic complex. *Systematic Botany*, v.14, p.389-397, 1989.
- BIERZYCHUDEK, P. Patterns in plant parthenogenesis. *Experientia*, v.41, p.1255-1264, 1985.
- BURTON, G., FORBES, I. Jr. The genetic and manipulation of obligate apomixis in common bahiagrass (*Paspalum notatum*). *Int. Grassl. Congr. Proc.*, v.8, p.66-71, 1960.
- BURTON, G. Effect of environment on apomixis in bahiagrass. *Crop Science*, v.22, p.109-111, 1982.
- CAMPBELL, C. S., DICKINSON, T.A. Apomixis, patterns of morphological variation, and species concepts in subfam. Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany*, v.15, p.124-135, 1990.
- CARMAN, J. G., CRANE, C. F., RIERA-LIZARAZU, O. Comparative histology of cell walls during meiotic and apomeiotic megasporogenesis in two hexaploid australasian *Elymus* species. *Crop Science*, v.31, p.1527-1532, 1991.
- CARMAN, J. G. Unifying our efforts to create apomictic crops. *Apomixis Newsletter*, v.5, p.47-50, 1992.
- CHAO, C. Y. Autonomos development of embryo in *Paspalum conjugatum* Berg. *Bot. Notiser*, v.133, p.215-222, 1980.
- CHRISTOFF, M., PAPASOVA, G. Die genetischen grundlagen der apomiktischen fortpflanzung in der gattung *Potentilla*. *Z. InduktAbstamm Vererbungslehre*, v.81, p.1-27, 1943.
- CLAUSEN, J. Partial apomixis as an equilibrium system in evolution. *Cariologia Suppl.*, v.6, p.469-479, 1954.
- CLAUSEN, J. Introgression facilitated by apomixis in polyploid poas. *Euphytica*, v.10, p.87-94, 1961.
- COE, G. E. Cytology of reproduction in *Cooperia pedunculata*. *Am. J. Bot.*, v.40, p.335-343, 1953.
- COLEMAN, J. R. Chromosome numbers in some brazilian Compositae. *Rhodora*, v.70, p.228-240, 1968.
- COLEMAN, J. R., COLEMAN, M. A. Apomixis in two triploid brazilian species of *Eupatorium*: *E. bupleurifolium* and *E.*



- callilepis. *Rev. Brasil. Genet.*, v.7, p.549-567, 1984.
- COLEMAN, M. A. Citogenética e Biologia da reprodução de *Eupatorium squalidum* DC. São José do Rio Preto, 1987, 105p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- COLEMAN, J. R., COLEMAN, M. A. Embryology and cytogenetics of apomictic triploid *Eupatorium squalidum* DC (Compositae). *Rev. Brasil. Genet.*, v.11, p.129-148, 1988.
- COLEMAN, J. R. Embryology and cytogenetics of apomictic hexaploid *Eupatorium odoratum* L. (Compositae). *Rev. Brasil. Genet.*, v.12, p.803-817, 1989.
- COLEMAN, J. R. Embryology and cytogenetics of sexual tetraploid *Eupatorium inulaefolium* H.B.K. *Rev. Brasil. Genet.*, v.14, p.123-133, 1991.
- COOPER, D. C., BRINK, R. A. The endosperm-embryo relationship in an autonomous apomict, *Taraxacum officinale*. *Botanical Gazette*, v.3, p.139-153, 1949.
- CRANE, C. F., CARMAN, J. G. Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from eastern Australia and New Zealand. *Am. J. Bot.*, v.74, p.477-496, 1987.
- CRONQUIST, A. *The evolution and classification of flowering plants*. The New York Botanical Garden, 1988. 555p.
- CZAPIK, R. The correlation of the first divisions of embryo and endosperm in apomictic plants. *Apomixis Newsletter*, v.3, p.15, 1991.
- DARLINGTON, C. D. *The evolution of genetic systems*. University Press Cambridge, England, 1939.
- DARLINGTON, C. D. *The evolution of genetic systems*. Basic Books Inc., New York, 1958.
- X DARLINGTON, C. D., LA COUR, L. F. *The handling of chromosomes*. Hafner Publishing Co., Darien, 1970.
- DAVIS, G. L. *Systematic Embryology of the Angiosperms*. John Wiley & Sons, Inc., 1966. 528p.
- DAVIS, G. L. Apomixis in the Compositae. *Phytomorphology*, v.17, p.270-277, 1967.



- D'CRUZ, R., REDDY, P. S. Inheritance of apomixis in *Dichanthium*. *Indian J. J. Plant Breeding*, v.31, p.451-460, 1971.
- DE WET, J. M. J. Diploid-tetraploid-haploid cycles and the origin of variability in *Dichanthium* agamospecies. *Evolution*, v.22, p.394-397, 1968.
- DE WET, J. M. J. Polyploidy and evolution in plants. *Taxon*, v.20, p.29-35, 1971.
- DE WET, J. M. J., HARLAN, J. R. Apomixis, polyploidy, and speciation in *Dichanthium*. *Evolution*, v.24, p.270-277, 1970.
- DE WET, J. M. J., STALKER, H. T. Gametophytic apomixis and evolution in plants. *Taxon*, v.23, p.689-697, 1974.
- DUMAS, C., KNOX, R.B. Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theor. Appl. Genet.*, v.67, p.1-10, 1983.
- DYER, A. F. *Investigating chromosomes*. Edward Arnold Publ, 1979. 138p.
- ERNST, A. *Dastardierung al Ursache der apogamie in pflanzenreich*. Jena, G. Fisher. 1918.
- ESAU, K. Morphology of reproduction in guayule and certain other species of *Parthenium*. *Hilgardia*, v.17, p.61-101, 1946.
- EVANS, L. T., KNOX, R. B. Environmental control of reproduction in *Themeda australis*. *Aust. J. Bot.*, v.17, p.375-389, 1969.
- FAGERLIND, F. Der zusammenhang zwischen perennitat, apomixis und polyploidie. *Hereditas*, v.30, p.179-200, 1944.
- FRYXELL, P. A. Mode of reproduction of higher plants. *The Botanical Review*, v.23, p.135-233, 1957.
- GENTCHEFF, G., GUSTAFSSON, A. The balance system of meiosis in *Hieracium*. *Hereditas*, v.26, p.209-249, 1940.
- GILDENHUYS, P. J., BRIX, K. Apomixis in *Pennisetum dubium*. *S. Afr. J. Agric. Sci.*, v.2, p.231-245, 1959.
- GRANT, V. *Plant Speciation*. Columbia University Press, New York and London, 1971. 435p.
- GRANT, V. *Genetics of flowering plants*. Columbia University Press, New York and London, 1975. 514p.
- GUSTAFSSON, A. Studies on the mechanism of parthenogenesis. *Hereditas*, v.21, p.1-112, 1935.



- GUSTAFSSON, A. The interrelation of meiosis and mitosis. I. The mechanism of agamospermy. *Hereditas*, v.25, p.289-322, 1939.
- 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. 370p.
- HAKANSSON, A. Die entwicklung des embryosacks und die befruchtung bei *Poa alpina*. *Hereditas*, v.29, p.25-61, 1943.
- HANNA, W. W., DASHAW, E. C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Sci.*, v.27, p.1136-1139, 1987.
- HARLAN, J. R., BROOKS, M. H., BORGAONKAR, D. S., DE WET, J. M. J. Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium*. *Botan. Gaz.*, v.125, p.41-46, 1964.
- HERR, J. M. Jr. A new clearing squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *Amer. J. Bot.*, v.58, p.785-790, 1971.
- HERR, J. M. Jr. Applications of a new clearing technique for the investigations of vascular plant morphology. *Journal Elisha Mitchell Scientific Society*, v.88, p.137-143, 1972.
- HERR, J. M. Jr. An analysis of methods for permanently mounting ovules cleared in four-and-a-half type clearing fluids. *Stain Technology*, v.57, p.161-169, 1982.
- HOLMGREN, I. Zytologische studien uber die fortpflanzung bei den gattungen *Erigeron* und *Eupatorium*. k. *Sven Vetenskapsakad. Handl.*, v.59, p.1-118, 1919.
- HUSSEY, M. A., BASHAW, E. C., HIGNIGHT, K. W., DAHMER, M. L. Influence of photoperiod on the frequency of sexual embryo sacs in facultative apomictic buffelgrass. *Euphytica*, v.54, p.141-145, 1991.
- IZMAILOV, R. Observations in embryo and endosperm development in various chromossomic types of the apomictic species *Ranunculus cassubicus* L. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.*, v.10, p.183-195, 1967.
- JACKSON, R. C. Evolution and systematic significance of polyploidy. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, v.7, p.209-234, 1976.



- JASSEM, B. Apomixis in the genus *Beta*. *Apomixis Newsletter*, v.2, p.7-17, 1990.
- JOHANSEN, A. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co., Inc. New York, 1940. 523p.
- JOHANSEN, A. *Plant embryology, embryogeny of the Spermatophyta*. Chronica Botanica Company, Mass., 1950. 305p.
- KAPIL, R. N., BHATNAGAR, A. K. Central cell: pre- and post-fertilization parameters. *Phytomorphology*, v.33, p.157-167, 1983.
- KING, R. M., ROBINSON, H. *Eupatorium*, a Composite genus of Arcto-tertiary distribution. *Taxon*, v.19, p.769-774, 1970.
- KING, R. M., ROBINSON, H. *The genera of the Eupatorieae (Asteraceae)*. Missouri Botanical Garden, 1987. 581p.
- KING, R. M., KYHOS, D. W., POWELL, A. M., RAVEN, P. H., ROBINSON, H. Chromosome numbers in Compositae, XIII. Eupatorieae. *Annals Missouri Botanical Garden*, v.63, p.862-889, 1976.
- KNOX, R. B., HESLOP-HARRISON, J. Experimental control of aposporous apomixis in a grass of the Andropogoneae. *Botan. Notiser*, v.116, p.127-141, 1963.
- KNOX, R. B. Apomixis: seasonal and population differences in a grass. *Science*, v.157, p. 325-326, 1967.
- LASER, K. D., LERSTEN, N. R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile Angiosperms. *Bot. Rev.*, v.39, p.425-454, 1972.
- LAWRENCE, G. H. M. *Taxonomy of Vascular Plants*. The McMillan Company, New York, 1959. 823p.
- LEVAN, A., FREDGA, K., SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, v.52, p.201-220, 1964.
- LILJEFORS, A. Cytological studies in *Sorbus*. *Acta Horti Bergiani Band*, v.17, p.47-113, 1955.
- LORENZI, H. (ed) *Plantas Daninhas do Brasil*. Nova Odessa, 1982. 74p.
- LUKINA, L., YUDIN, B. Apomixis in maize x *Tripsacum* hybrids: new cases of autosegregation. *Apomixis Newsletter*, v.4, p.12, 1992.



- LUMARET, R. Adaptive strategies and ploidy levels. *Acta Oecol. Plant.*, v.9, p.83-93, 1988.
- MAHESHWARI, P. *An introduction to the embryology of angiosperms*. McGraw-Hill Co.; New York, 1950. 453p.
- 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.*, v.14, p.179-197, 1971.
- MARSHALL, D. R., BROWN, A. H. D. The evolution of apomixis. *Heredity*, v.47, p.1-15, 1981.
- MATZK, F. A novel approach to differentiated embryos in the absence of endosperm. *Sex Plant Reprod.*, v.4, p.88-94, 1991.
- MOGIE, M. A model for the evolution and control of generative apomixis. *Biol. J. Linn. Soc.*, v.35, p.127-153, 1988.
- MONTGOMERY, J. D., FAIRBROTHERS, D. E. A biosystematic study of the *Eupatorium rotundifolium* complex (Compositae). *Brittonia*, v.22, p.134-150, 1970.
- MOSKOVA, R. D., YAKOVLEV, A. Apomixis of *Bothriochloa ischaemum* L. Flowering, pollination, fertilization. In: LINSKENS, H. F. (ed) *Fertilization in Higher Plants*. North-Holland Publ. Amsterdam, pp. 341-349. 1974.
- NAUMOVA, T. Apomixis and amphimixis in angiosperms: classification. *Apomixis Newsletter*, v.2, p.33-38, 1990.
- NOACK, K. L. Über hypericum-kreuzungen VI. Fortpflanzungsverhalt und bastarde von *Hypericum perforatum*. *Z. Indukt Abst. Vererbung.*, v.76, p.569-601, 1939.
- NOGLER, G. A. Genetik der aposporie bei *Ranunculus auricomus*. II. Endospermizytologie - Ber. Schweiz. Bot. Ges., v.82, p.54-63, 1972.
- NOGLER, G. A. Genetics of apospory in *Ranunculus auricomus*. IV. Embryology of F3 and F4 backcross offspring. *Phytomorphology*, v.25, p.485-490, 1975.
- NOGLER, G. A. How to obtain diploid apomictic *Ranunculus auricomus* plants not found in the wild state. *Botanica Helvetica*, v.92, p.13-22, 1982.

- NOGLER, G. A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, D. M. (ed). *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1984a. p.475-515.
- NOGLER, G. A. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. *Botanica Helvetica*, v.94, p.411-422, 1984b.
- NOGLER, G. A. Genetics of apomictic reproduction. *Giornale Botanico Italiano*, v.120, p.49-52, 1986.
- NOGLER, G. A. Cytogenetics of parthenogenesis - first results on *Ranunculus auricomus*. *Apomixis Newsletter*, v.1, p.44-47, 1989.
- NYBOM, H. Apomixis versus sexuality in blackberries (*Rubus* subgen. *Rubus*, Rosaceae). *Pl. Syst. Evolut.*, v.160, p.207-218, 1988.
- NYGREN, A. Apomictic and sexual reproduction in *Calamagrostis purpurea*. *Hereditas*, v.35, p.285-300, 1949.
- NYGREN, A. Cytological and embryological studies in arctic Poae. *Symb. Bot. Ups.*, v.10, p.1-64, 1950.
- NYGREN, A. Apomixis in the angiosperms. *The Botanical Review*, v.20, p.577-649, 1954.
- OKABE, S. Parthenogenesis bei *Ixeris dentata*. *Bot. Mag.*, v.46, p.518-523, 1932.
- ORNDUFF, R. Reproductive biology in relation to systematics. *Taxon*, v.18, p.121-133, 1969.
- ORNDUFF, R. Pathways and patterns of evolution - a discussion. *Taxon*, v.19, p.202-204, 1970.
- PAMILO, P. Heterozygosity in apomictic organisms. *Hereditas*, v.107, p.95-101, 1987.
- PODDUBNAJA-ARNOLDI, W. A. Geschlechtliche und ungeschlechtliche Fortpflanzung bei cinegen *Chondrilla*. *Planta*, v.19, p.46-86, 1933.
- PORTER, C. L. *Taxonomy of flowering plants*. W. H. Freeman and Company, 1959. 452p.
- POWERS, L. Fertilization without reduction in guayule *Parthenium argentatum* and a hypothesis as to the evolution of apomixis and polyploid. *Genetics*, v.30, p.323-346, 1945.



- QUARIN, C. L., HANNA, W. W. Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Sci.*, v.20, p.69-75, 1980.
- REDDY, P. S., D'CRUZ, R. Mechanism of apomixis in *Dichanthium annulatum* Stapf. *Botanical Gazette*, v.130, p.71-79, 1969.
- REUSCH, J. D. H. The relationship between reproductive factors and seed set in *Paspalum dilatatum*. *Afr. J. Agric. Sci.*, v.4, p.513-530, 1961.
- RICHARDS, A. J. *Plant Breeding Systems*. George Allen and Unwin, London, 1986. 529p.
- RODKIEWICZ, D. Callose in cell walls during megasporogenesis in Angiosperms. *Planta*, v.93, p.39-47, 1970.
- ROBINSON, H., KING, R. M. Phytogeographical patterns in the tribe Eupatorieae (Asteraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.*, v.19, p.45-52, 1980.
- ROZENBLUM, E., MALDONADO, S., WAISMAN, C. E. Apomixis in *Eupatorium tanacetifolium* (Compositae). *Amer. J. Bot.*, v.75, p.311-322, 1988.
- RUAS, C. F. Evolução cariotípica no gênero *Mikania* Willd (Compositae). Piracicaba, 137p, 1989. Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- RUTISHAUSER, A. Pseudogamie und polymorphie in der gattung *Potentilla*. *Arch. Julius Klaus - Stift Vererbunsforsch*, v.23, p.267-424, 1948.
- RUTISHAUSER, A. Die enwicklungserregung der elizelle bei pseudogamen arten der gattung *Ranunculus*. *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.*, v.10, p.491-512, 1954.
- SARAN, S., DE WET, J. M. J. The mode of reproduction in *Dichanthium intermedium* (Gramineae). *Bull. Torrey Botan. Club*, v.97, p.6-13, 1970.
- SARAN, S., DE WET, J. M. J. Environmental control of reproduction in *Dichanthium intermedium*. *J. Cytol. Genet.*, v.11, p.22-28, 1976.
- SAVIDAN, Y. H. L'apomixie gametophytique chez les graminées et son utilisation en Amélioration des plantes. *Ann. Amélior*



- Plant*, v.28, p.1-9, 1978. *Origins and Evolution in Plants*, Columbia.
- SAVIDAN, Y. H. Genetics and Utilization of apomixis for the improvement of Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.). *Proc. XIV Int. Grassl. Congr.*, p. 182-184, 1981.
- SAVIDAN, Y. H. Evolução em gramíneas tropicais com especial referência a apomixia. I. *Congresso sobre Citogenética e Evolução de Plantas*, p.37-50, 1984.
- SAVIDAN, Y. H. Apomixis and development. *Apomixis Newsletter*, v.3, p.39-47, 1991. *Origins of Grasses*, *Proceedings*, v.21, p.191-224.
- SAVIDAN, Y. H., PERNES, J. Diploid-tetraploid-dihaploid cycles and the evolution of *Panicum maximum* Jacq. *Evolution*, v.36, p.596-600, 1982. *Eriosema canus* (Heteropogon) Br. J. Bot.,
- SCHELL, J. H. N., KIEFT, H., VAN LAMMEREN, A. A. M. Interactions between embryo and endosperm during early developmental stages of maize caryopses (*Zea mays*). *Can. J. Bot.*, v.62, p.2842-2853, 1984.
- SKALINSKA, M. Further studies in facultative apomixis of *Hieracium aurantiacum* L.. *Acta Biolog. Cracov.*, v.16, p.121-137, 1973. *Origins of Grasses*,
- SMITH, G. L. Studies in *Potentilla*. I. Embryological investigations into the mechanism of agamospermy in British *P. tabernaemontani*. *New Phytol.*, v.62, p.264-282, 1963.
- SNYDER, L. A., HERNANDEZ, A. R., WARMKE, H. E. The mechanism of apomixis in *Pennisetum ciliare*. *Bot. Gaz.*, v.116, p.209-221, 1955. *Origins of Grasses*,
- SNYDER, L. A. Apomixis in *Paspalum secans*. *Am. J. Bot.*, v.44, p.318-324, 1957. *Advances in embryology and development*,
- SOLNZEVA, M. P. What, then, is apomixis in flowering plants? *Apomixis Newsletter*, v.2, p.28-33, 1990. *Origins of Grasses* and in
- SPARVOLI, E. Osservazioni cito-embriologiche in *Eupatorium riparium*. II. Megasporogenesi e sviluppo del gametofito femminile. *Annali di Botanica*, v.26, p.481-504, 1960. *Origins of Grasses*,
- STEBBINS, G. L. Jr. Cytology of *Antennaria*. II. Parthenogenetic species. *Botanical Gazette*, v. 94, p.322-346, 1932. *Eupatorium*
- STEBBINS, G. L. Jr. Apomixis in the angiosperms. *The Botanical Review*, v.7, p.507-542, 1941.

- STEBBINS, G. L. Jr. *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press, New York, 1950, 643p.
- STEBBINS, G. L. Jr. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Addison-Wesley Publ. Co. 1971, 216p.
- STEBBINS, G. L. Jr., BABCOCK, E. B. The effect of polyploidy and apomixis on the evolution of species in *Crepis*. *Journal of Heredity*, v.30, p.519-530, 1939.
- STEBBINS, G. L. Jr., JENKINS, J. A. Aposporic development in the north american species of *Crepis*. *Genetica*, v.21, p.191-224, 1939.
- STRATTON, D. A. Life history variation within populations of an asexual plant, *Erigeron annuus* (Asteraceae). *Am. J. Bot.*, v.78, p.723-728, 1991.
- SULLIVAN, V. I. Diploidy, polyploidy, and agamospermy among species of *Eupatorium* (Compositae). *Can. J. Bot.*, v.54, p.2907-2917, 1976.
- TALIAFERRO, C. M., BASHAW, E. C. Inheritance and control of obligate apomixis in breeding buffelgrass, *Pennisetum ciliare*. *Crop Sci.*, v.6, p.473-476, 1966.
- TURNER, B. L., IRWIN, H. S. Chromosome numbers in the Compositae. II. Meiotic counts for fourteen species of brazilian Compositae. *Rhodora*, v.62, p.122-126, 1960.
- VIJAYARAGHAVAN, M. R., PRABHAKAR, K. The endosperm. In: JOHRI, B. M. (ed). *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1984.
- WAKANA, A., UEMOTO, S. Adventive embryogenesis in *Citrus*. I. The occurrence of adventive embryos without pollination or fertilization. *Am. J. Bot.*, v.74, p.517-530, 1987.
- WARMKE, G. Apomixis and sexuality in *Hierocloe australis* and in Swedish *H. odorata* on different polyploid levels. *Bot. Not.*, v.120, p.209-235, 1954.
- WEBBER, J. M. Polyembryony. *The Botanical Review*, v.6, p.575-598, 1940.
- WHITTEMORE, A. The sectional nomenclature of *Eupatorium* (Asteraceae). *Taxon*, v.36, p.618-620, 1987.



- WILLEMSE, M. T. M. Polarity during megasporogenesis and megagametogenesis. *Phytomorphology*, v.31, p.124-134, 1981.
- WILLEMSE, M. T. M., NAUMOVA, T. Apomictic genes and seed plant reproduction. *Apomixis Newsletter*, v.5, p.19-32, 1992.
- WINKLER, H. Über parthenogenesis and apogamie in Pflanzenreich. *Frag. Rei. Bot.*, v.2, p.293-454, 1908.
- YAHARA, T., ITO, M., WATANABE, K., CRAWFORD, D. J. Very low genetic heterozygosities in sexual and agamospermous populations of *Eupatorium altissimum* (Asteraceae). *Am. J. Bot.*, v.78, p.706-710, 1991.
- YUDIN, B. F., SOKOLOV, V. A. Has regular apomixis been transferred to maize? *Apomixis Newsletter*, v.3, p.33-34, 1991.



VIII. APÊNDICE.

1. Cloral hidratado

1. Preparo dos reagentes e das drogas usadas nas técnicas descritas:

1a. FAA (líquido)

500 ml álcool etílico (95%) para clarificar e nas preparações

50 ml ácido acético para meios mitóticos.

115 ml formaldeído (35%)

335 ml água destilada

Uso: Na fixação de óvulos para o estudo da megasporogênese

1b. CARNOY

3 partes de álcool etílico absoluto

1 parte ácido acético glacial

Uso: Na fixação de anteras para o estudo da microsporogênese e pontas de raízes para estudos de cariótipo.

1c. CARMIM ACÉTICO

50 ml ácido acético glacial

50 ml água destilada

1,2 g carmim

Uso: Na coloração de cromossomos meióticos e mitóticos.

1d. 0,002 M OXIQUEINOLÉINA

Dissolver 0,29 g em 1 litro de água destilada.

Uso: Para pré-tratar pontas de raízes nos estudos de cromossomos mitóticos.

1e. HERR (solução 4 1/2)

Fenol 1

Cloral hidratado 1

óleo de cravo 1

Ácido láctico 1

Xilol 1/2

Uso: Na clarificação de óvulos inteiros.



DOAÇÃO	
Data	01/05/92
Procedência	Unesp
R\$ 10,00	

1º. MEIO DE HOYER

200 g cloral hidratado

50 ml água destilada

30 g goma arábica

16 ml glicerina

Uso: Na montagem de óvulos clarificados e nas preparações permanentes de cromossomos meióticos e mitóticos.

