

**Maristela Sanches Bertasso Borges**

**Citogenética e Embriologia de *Eupatorium*  
*Polystachium*, *E. Purpurascens* e *E. Laevigatum*  
(Compositae)**

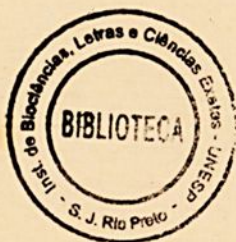


1910000900



MARISTELA SANCHES BERTASSO BORGES

**CITOGENÉTICA E EMBRIOLOGIA DE *EUPATORIUM*  
*POLYSTACHIUM*, *E. PURPURASCENS* E  
*E. LAEVIGATUM* (COMPOSITAE)**



900/00

Tese apresentada para obtenção  
do Grau de Doutor em Ciências  
Biológicas-Genética.

---

São José do Rio Preto - SP  
2000

Orientador: Prof. Dr. James Robert Coleman





Este trabalho foi realizado nos Departamentos de Biologia e Botânica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de São José do Rio Preto, SP.



*Dedico*

*ao meu querido marido Carlos, amigo e companheiro sempre presente*

*aos meus amados pais Alcides e Odete, por tudo que sou,  
por todo apoio e dedicação*

*ao Professor Coleman, por estes anos de convivência*



*“Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo.  
Por isso aprendemos sempre”*

*Paulo Freire*



## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas e de forma especial:

Ao Prof. Dr. **James Robert Coleman**, pela orientação segura e amiga, pela dedicação e apoio constantes, meu agradecimento muito especial.

Ao Prof. Dr. **Gerhard Bandel** e às Profas. Dras. **Ana Maria Alves de Oliveira**, **Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira** e **Mary Massumi Itoyama**, pela atenção e sugestões na análise da pró-forma.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – UNESP, pelas condições materiais que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Direção do Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP, pela disposição das condições materiais.

Aos Departamentos de Botânica e Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – UNESP, através das respectivas chefias, pela acolhida e cessão de equipamentos e dependências necessários para a realização deste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação, pelo auxílio em todos os momentos necessários.

Aos professores dos Departamentos de Botânica e Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – UNESP, pela amizade, incentivo, conhecimento e experiência profissional que proporcionaram meu amadurecimento científico.

Aos funcionários do Departamento de Botânica, **Maria Helena Carabolante**, **Regiane Peres** e **Ademir Veschi**, pelos auxílios e amizade.

Aos funcionários da Biblioteca, pela presteza e auxílio na aquisição dos artigos científicos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, pelos esclarecimentos e atenção.

A todos os amigos do Curso de Pós-Graduação, pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos do Centro Universitário de Rio Preto, pelo companheirismo, estímulos e amizade.



Aos funcionários do Núcleo Central de Informática do Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP, especialmente à **Rosângela Márcia Borges de Souza** e **Michele Fúlvia Angelo**, pela gentileza e cuidado durante a impressão deste trabalho.

Ao meu querido tio Sr. **Benedito Ferreira Ribeiro**, pelo capricho na confecção dos ideogramas e nas indicações das figuras.

Aos meus pais **Alcides e Odete**, por tudo o que representam para mim, pelo amor, alegria e educação.

Ao **Carlos**, companheiro e amigo, pela paciência e compreensão, pelo amor e apoio constantes.

A toda minha família, por todo apoio e carinho e, de maneira muito especial, ao **Felipe** e à **Flávia**, meus amados sobrinhos, pela alegria que me proporcionam.

À Deus, por tudo.



## ÍNDICE

|                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>I. INTRODUÇÃO</b>                                                                     | 1   |
| 1. O fenômeno apomítico                                                                  | 1   |
| 2. Formação do embrião e endosperma nas espécies apomíticas                              | 7   |
| 3. Meiose e esporogênese nas espécies apomíticas                                         | 10  |
| 4. Regulação genética da apomixia                                                        | 13  |
| 5. Influência da poliploidia e hibridização sobre apomixia                               | 16  |
| 6. Significado evolutivo da apomixia                                                     | 18  |
| 7. Apomixia e melhoramento vegetal                                                       | 19  |
| 8. A família Compositae (Asteraceae) e o gênero <b>Eupatorium</b> : caracterização geral | 21  |
| 9. Objetivos                                                                             | 22  |
| <b>II. MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                            | 24  |
| <b>III. RESULTADOS</b>                                                                   | 31  |
| 1. <b>Eupatorium polystachium</b>                                                        | 31  |
| 1.1 Embriologia                                                                          | 31  |
| 1.2 Microsporogênese e viabilidade do pólen                                              | 37  |
| 1.3 Ocorrência de polinização                                                            | 40  |
| 1.4 Cariótipo                                                                            | 41  |
| 1.5 Produção e germinabilidade de sementes                                               | 53  |
| 2. <b>Eupatorium purpurascens</b>                                                        | 55  |
| 2.1 Embriologia                                                                          | 55  |
| 2.2 Microsporogênese e viabilidade do pólen                                              | 60  |
| 2.3 Ocorrência de polinização                                                            | 64  |
| 2.4 Cariótipo                                                                            | 65  |
| 2.5 Produção e germinabilidade de sementes                                               | 72  |
| 3. <b>Eupatorium laevigatum</b>                                                          | 74  |
| 3.1 Embriologia                                                                          | 74  |
| 3.2 Microsporogênese e viabilidade do pólen                                              | 79  |
| 3.3 Ocorrência de polinização                                                            | 83  |
| 3.4 Cariótipo                                                                            | 84  |
| 3.5 Produção e germinabilidade de sementes                                               | 90  |
| <b>IV. DISCUSSÃO</b>                                                                     | 92  |
| <b>V. RESUMO</b>                                                                         | 100 |
| <b>VI. SUMMARY</b>                                                                       | 103 |
| <b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                   | 106 |
| <b>VIII. APÊNDICE</b>                                                                    | 119 |



# I. INTRODUÇÃO

## 1. O fenômeno apomítico

Nas angiospermas a reprodução sexuada ocorre através da união dos gametas feminino (oosfera) e masculino (célula generativa), ambos reduzidos cromossomicamente durante a meiose. Nas plantas sexuadas, os gametas femininos são resultantes de meiose em células mãe de megásporos (megasporócitos), contidas nos ovários, enquanto os gametas masculinos resultam de meiose nas células mãe de micrósporos (microsporócitos), contidas nas anteras. Assim, a meiose precede a formação dos gametas enquanto a fertilização restaura o número cromossômico somático. Dupla fertilização é o processo pelo qual um núcleo generativo funde-se à oosfera para produzir o zigoto, enquanto um segundo núcleo generativo une-se ao núcleo central para formar o endosperma, o tecido nutritivo do embrião. Portanto, meiose e fertilização são processos que antecedem o desenvolvimento da geração esporofítica em plantas sexuadas.

Em certos grupos de angiospermas a reprodução sexuada é regularmente combinada ou substituída por um processo de reprodução assexuada denominado apomixia. Winkler (1908) incluiu em sua definição de apomixia os vários tipos de reprodução vegetativa por meio de sementes, bulbos, bulbilhos, estolões e rizomas. Segundo Asker (1979), entre outros, mais importantes são os casos nos quais as sementes são formadas sem a fertilização da oosfera, fenômeno denominado agamospermia. Agamospermia é um fenômeno reprodutivo que consiste de dois processos essenciais: apomeiose, isto é, a formação de oosferas não reduzidas e partenogênese, ou seja, a formação de embriões sem singamia (Kojima & Nagato, 1992). De acordo com Dujardin & Hanna (1994), agamospermia é um processo reprodutivo controlado geneticamente que elimina (ou modifica) a meiose feminina e a singamia para produzir embriões idênticos à planta mãe. Uma diferença fundamental entre os processos agamospérmico e sexuada é que, no primeiro, o embrião é derivado unicamente de células do tecido materno do óvulo. Atualmente, os termos apomixia e agamospermia são considerados equivalentes (Asker, 1984; Nogler, 1984a) e os demais tipos de reprodução vegetativa são excluídos do conceito de apomixia.

De acordo com Koltunow (1993), na reprodução sexuada o óvulo tem um papel multifuncional porque é o local onde ocorrem os processos seqüenciais de gametogênese feminina, fertilização e desenvolvimento do embrião. Uma



seqüência definida de eventos deve estar completa para resultar na geração de uma semente fértil e geneticamente única, como produto final da reprodução sexuada. Esta seqüência compreende os seguintes eventos: diferenciação da célula mãe de megásporos a partir da nucela, produção de megásporos através de meiose (megasporogênese), seleção do megásporo funcional, desenvolvimento do saco embrionário através de processos mitóticos (megagametogênese), maturação do saco embrionário, dupla fertilização e formação do embrião e endosperma. Nestas plantas, a ausência ou interrupção de qualquer um destes eventos resulta na suspensão do programa de desenvolvimento e no aborto da semente.

Em contraste com a reprodução sexuada, processos agamospérmicos omitem de forma regular alguns dos eventos desta seqüência e, ainda assim, produzem embriões viáveis. O saco embrionário, quando formado, pode ser derivado de divisões mitóticas ou de meiose modificada de uma célula mãe de megásporos ou ainda através de divisões mitóticas de uma célula somática do óvulo, resultando em oosferas não reduzidas, a partir das quais o embrião se origina partenogeneticamente. Portanto, meiose e fertilização da oosfera não antecedem o desenvolvimento do embrião e, assim, a progênie de plantas agamospérmicas é constituída de réplicas exatas da planta mãe (Hanna & Bashaw, 1987).

Nogler (1984a) afirmou que o fenômeno agamospérmico inclui, fundamentalmente, dois modos de reprodução: a embrionia adventícia e a apomixia gametofítica. Na embrionia adventícia, o embrião se desenvolve sem a formação de saco embrionário, a partir de células de tecidos externos ao saco embrionário, podendo ser derivado de dois tecidos somáticos diferentes do óvulo maduro: a nucela e o integumento interno (Lakshmanan & Ambegaokar, 1984; Koltunow, 1993). A forma nucelar da embrionia adventícia é a mais comum. Segundo Wakana & Uemoto (1987), em *Citrus* e em alguns outros gêneros que apresentam embrionia adventícia, polinização e subsequente fertilização de um saco embrionário sexuada são pré-requisitos para iniciação de embriões adventícios no óvulo. A presença do embrião sexuada estimula a formação de embriões adventícios na nucela e, deste modo, a semente madura pode conter além do embrião sexuada, um, dois, ou raramente mais, embriões adventícios. O desenvolvimento dos embriões adventícios depende do endosperma originado nos sacos embrionários sexuados. A produção de dois ou mais embriões num mesmo óvulo é denominada poliembrionia (Webber, 1940).

Na apomixia gametofítica o saco embrionário pode originar-se de um megásporo não reduzido ou de uma célula somática do óvulo. A apomixia gametofítica inclui dois processos distintos de formação do saco embrionário não reduzido, baseado no tipo de célula inicial envolvida: a) diplosporia, na qual o saco embrionário origina-se da célula mãe de megásporos diretamente através de mitose ou indiretamente através de meiose modificada, neste caso com a formação de um núcleo de restituição; b) aposporia, na qual o saco embrionário origina-se de uma célula somática do óvulo, usualmente da nucela. Em ambos os casos o saco embrionário originado é não reduzido e tende a apresentar o mesmo padrão de formação observado nas espécies sexuadas relacionadas. Apomixia gametofítica sempre implica em duas modificações principais quando comparada à reprodução sexuada: a formação de sacos embrionários não reduzidos e a capacidade da oosfera de se desenvolver partenogeneticamente (Maheshwari, 1950).

Diplosporia é composta de três subtipos: *Antennaria*, *Taraxacum* e *Ixeris*. Destes, o subtipo *Antennaria* é o mais freqüente, sendo descrito primeiramente em *Antennaria alpina*, na qual a célula mãe de megásporos não entra em meiose mas, após um longo período de intérfase, cresce e sofre vacuolização agindo, então, como um megásporo não reduzido. Três mitoses levam à formação do saco embrionário 8-nucleado, maduro. Este subtipo de diplosporia é amplamente distribuído entre espécies dos gêneros *Antennaria* (Davis, 1967; Stebbins, 1932), *Eupatorium* (Holmgren, 1919; Sparvoli, 1960; Coleman & Coleman, 1984, 1988; Coleman, 1989), *Poa* (Gustafsson, 1939), *Calamagrostis* (Nygren, 1949), *Parthenium* (Esau, 1946), *Elastotema* (Fagerlind, 1944), entre outras.

O subtipo *Taraxacum* 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. Conseqüentemente, a primeira divisão meiótica resulta na formação de um núcleo de restituição que engloba todo o complemento cromossômico somático e a segunda em uma díade não reduzida. Usualmente, a célula da região chalazal dessa díade sofre três mitoses levando à formação do saco embrionário 8-nucleado. Representantes importantes do subtipo *Taraxacum* estão entre os gêneros *Taraxacum* (Gustafsson, 1939; Johansen, 1950; Davis, 1967); *Erigeron* (Holmgren, 1919); *Arabis* e *Paspalum* (Khush *et al.*, 1994), entre outros.

O subtipo *Ixeris*, como o *Taraxacum*, caracteriza-se pela ocorrência de uma divisão meiótica assindética levando à formação de um núcleo de restituição,



que passa por uma divisão correspondente à segunda divisão meiótica, porém não ocorre citocinese, o que resulta em um saco embrionário contendo dois núcleos. Duas divisões mitóticas subseqüentes resultam no saco embrionário 8-nucleado. O subtipo *Ixeris* é de ocorrência limitada sendo encontrado no gênero *Ixeris* (Okabe, 1932) e em alguns outros representantes da família Compositae, como *Rudbeckia* (Nygren, 1954) e *Erigeron* (Gustafsson, 1935) e também na família Plumbaginaceae (Nogler, 1984a).

Gustafsson (1946) sugeriu que os subtipos de diplosporia podem ser influenciados por fatores ambientais. Sparvoli (1960) demonstrou que em *Eupatorium riparium* há uma mudança do “subtipo mitótico” (*Antennaria*) para o “subtipo meiótico” (*Taraxacum*) de acordo com as condições de cultivo. Seus resultados sugerem que não há diferenças fundamentais entre estes subtipos de diplosporia.

Segundo Burson (1994), para se distinguir entre sacos embrionários diplospóricos e sexuais, os estágios iniciais de desenvolvimento no óvulo devem ser cuidadosamente observados. A melhor evidência de diplosporia é a ausência de meiose e, conseqüentemente, de uma tétrade de megásporos ou de qualquer resquício da tétrade. A presença de uma célula mãe de megásporos alongada estendendo-se desde a micrópila até o centro do óvulo sugere desenvolvimento diplospórico.

Na aposporia o saco embrionário não reduzido surge a partir de células somáticas no óvulo, usualmente da nucela. Várias células podem iniciar desenvolvimento apospórico mas, normalmente, somente uma dá origem ao saco embrionário maduro. Aposporia inicia-se após a diferenciação da célula mãe de megásporos que, geralmente, sofre meiose e origina os quatro megásporos. Porém, os megásporos são eliminados pela invasão da célula apospórica e o saco embrionário apospórico ocupa a posição próxima à micrópila. Uma vez ocupado o lóbulo nucelar, a célula apospórica sofre três divisões mitóticas formando o saco embrionário maduro, não reduzido. O embrião desenvolve-se partenogeneticamente a partir da oosfera não reduzida mas a polinização é necessária para o desenvolvimento do endosperma (Khush *et al.*, 1994). A célula apospórica inicial é primariamente reconhecida pelo crescimento vigoroso, pelo grande tamanho de seu núcleo, especialmente do nucléolo, e por ser altamente vacuolizada, causando compressão e degeneração dos megásporos sexuais (Nogler, 1984a). Nas espécies apospóricas não ocorre meiose durante o

desenvolvimento dos sacos embrionários apospóricos. Em tais plantas, a formação de sacos embrionários reduzidos e não reduzidos pode ocorrer simultaneamente no mesmo óvulo. Porém, usualmente, a célula mãe de megásporos ou os produtos de sua divisão meiótica são esmagados pela célula apospórica, de forma que somente o saco embrionário apospórico persiste. De acordo com Bashaw & Hanna (1990), aposporia é o mecanismo de apomixia predominantemente encontrado em gramíneas, somando mais de 95% das espécies apomíticas conhecidas. Aposporia já foi observada 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), *Pennisetum* (Chapman & Busri, 1994), *Lamprothyrus* (Connor & Dawson, 1993), entre outras.

Uma forma peculiar de aposporia ocorre na família Gramineae, na qual durante o desenvolvimento do saco embrionário não ocorre a terceira divisão mitótica e, assim, o saco embrionário maduro contém quatro núcleos (duas sinérgides, oosfera e núcleo polar) ao invés dos oito núcleos característicos. Portanto, nesta família, os sacos embrionários apospóricos distinguem-se dos sexuais por sua estrutura. Savidan (1984) afirmou que o aumento de tamanho e a diferenciação das células apospóricas nas gramíneas tropicais ocorre, geralmente, antes do início da meiose, o que facilita o estudo de frequência de sacos embrionários sexuais e apospóricos no nível de populações.

Segundo Koltunow (1993), cada um dos tipos de agamosperma apresenta um período diferente de início de desenvolvimento do óvulo em relação à reprodução sexual. Diplosporia e aposporia são iniciadas precocemente, junto com a diferenciação da célula mãe de megásporos no caso de diplosporia ou após a diferenciação na aposporia. Em contraste, embrião adventício é iniciado tardiamente em óvulos já maduros. O tempo de iniciação da aposporia é um indicador se processos sexuais e apospóricos podem coexistir num mesmo óvulo. Christoff & Papasova (1943) demonstraram que em *Potentilla* quando a iniciação da aposporia é suficientemente precoce os sacos embrionários são totalmente apospóricos, enquanto que se a iniciação for tardia e a formação do megagametófito sexual estiver relativamente avançada ambos os tipos de saco embrionário podem coexistir.

Apomixia está amplamente distribuída entre as angiospermas. Mais de 300 espécies espalhadas em 35 famílias são apomíticas, o que indica uma origem polifilética para o fenômeno (Khush *et al.*, 1994). Richards (1986) afirmou que



agamospermia está presente em cerca de 15% das famílias de angiospermas, mas que 75% dos táxons agamospérmicos pertencem a apenas 3 famílias: Compositae, Gramineae e Rosaceae. Portanto, é possível supor que as espécies destas famílias, que apresentam altos níveis de poliploidia e hibridização, são de alguma forma “pré-adaptadas” à agamospermia, as compostas à diplosporia e gramíneas e rosáceas à aposporia.

Agamospermia pode ser obrigatória ou facultativa, dependendo da produção de sementes se inteiramente por via assexuada ou em parte sexuada. Um agamospérmico obrigatório apresenta as seguintes características: não ocorrência de meiose reducional nem fusão sexual, desenvolvimento partenogenético do embrião e, com exceção das espécies pseudogâmicas, desenvolvimento espontâneo do endosperma (Richards, 1986). Agamospérmicos facultativos, ao contrário, têm a capacidade de se reproduzir tanto sexuada quanto apomiticamente. Tais plantas produzem oosferas não reduzidas e reduzidas que podem se desenvolver partenogeneticamente ou após fertilização, respectivamente.

Schmidt & Antlfinger (1992) afirmaram que o grau de sexualidade exibido por uma espécie agamospérmica é uma junção de fatores genéticos e ambientais. A frequência com que embriões sexuais são observados em apomíticos facultativos é altamente variável e influenciada pelo ambiente. Saran & De Wet (1976) demonstraram que *Bothriochloa intermedia* se reproduz sexualmente durante o verão e através de agamospermia durante o inverno. Knox (1967) e Knox & Heslop-Harrison (1963) encontraram diferenças significativas na formação de sacos embrionários apomíticos e sexuais relacionadas ao regime de luz e alterações de 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 agamospermia em *Paspalum notatum*, encontrou que uma alteração no comprimento do dia de 10 para 14 horas fez com que um clone apomítico se reproduzisse sexualmente. Evans & Knox (1969) demonstraram para *Themeda australis* que dias curtos induzem a formação de sacos embrionários apospóricos. Hu *et al.* (1991) induziram quimicamente a formação de sementes apomíticas em milho através do uso de diferentes combinações de reguladores de crescimento, colchicina e dimetil sulfoxido (DMSO). Gounaris *et al.* (1991) demonstraram que a presença de sais orgânicos modifica a frequência de sacos embrionários sexuais e apospóricos em *Cenchrus ciliaris*. Em *Medicago sativa* subsp *falcata* a ocorrência de diplosporia foi



maior em câmaras de crescimento (temperatura mais elevada, maior variação de fotoperíodo e maior intensidade luminosa) do que em condições de campo (Barcaccia *et al.*, 1997). Por outro lado, Hussey *et al.* (1991) trabalhando com *Pennisetum ciliare* concluíram que não existe relação entre fotoperíodo e frequência de sacos embrionários sexuais, sob condições de campo e controladas.

## 2. Formação do embrião e endosperma nas espécies apomíticas

Cooper & Brink (1949) afirmaram que o endosperma é fundamental para o desenvolvimento da semente pois realiza duas funções básicas: a) elabora e acumula nutrientes que serão absorvidos pelo embrião e b) exerce uma ação reguladora nas porções maternas da semente, particularmente durante os estágios iniciais de pós-fertilização. Em apomíticos pseudogâmicos e plantas sexuadas, fertilização do núcleo central resulta no desenvolvimento do endosperma, cuja função inicial é absorver e transferir nutrientes a partir dos tecidos maternos para o embrião em crescimento (Schell *et al.*, 1984). Kapil & Bhatnagar (1983) acreditam que enzimas da célula central são responsáveis pelo início da hidrólise da nucela e integumentos. Na família Gramineae, aborto de pró-embrião em cruzamentos inter-específicos é causado por distúrbios no desenvolvimento do endosperma, o que leva a crer que o desenvolvimento do embrião necessita de nutrientes vindos do endosperma (Masand & Kapil, 1966). Matzk (1991), no entanto, afirmou que o desenvolvimento do endosperma exerce apenas efeito regulador na nutrição do pró-embrião, podendo ser substituído pela aplicação de auxina, o que faz com que o embrião originado partenogeneticamente seja capaz de absorver nutrientes de tecidos maternos vizinhos diretamente ou via suspensor.

Durante o desenvolvimento da semente em angiospermas, a oosfera desenvolve-se num embrião, a célula central fertilizada dá origem ao endosperma e os integumentos do óvulo formam a testa da semente. Durante a reprodução sexuada, estes três processos são dependentes da dupla fertilização da oosfera e da célula central. Em contraste, em espécies apomíticas uma ou mais destas vias de desenvolvimento são ativadas na ausência de fertilização (Drews *et al.*, 1998).

De acordo com Lopes & Larkins (1993), o balanço genético existente entre o endosperma, o embrião e os tecidos maternos é considerado a "chave" necessária para o desenvolvimento normal da semente, embora estas interações permaneçam não esclarecidas totalmente. Estes autores consideram o endosperma como o meio que sustenta a embriogênese, também atuando como fonte de





nitrogênio, enxofre, minerais e energia para o embrião durante o processo de germinação. Pouco se sabe a respeito do momento no qual o embrião começa a utilizar o endosperma para nutrição. Por exemplo, não é claro se o embrião recebe passivamente nutrientes mobilizados pelo endosperma ou se tal processo é coordenado apenas pelo desenvolvimento do embrião ou se por uma ação conjunta desses tecidos. Certamente, adaptações estruturais e fisiológicas controlando tais interações e o crescimento coordenado de endosperma e embrião devem ser necessárias, porém não existem indícios sobre o estabelecimento e a regulação destas interações.

Em *Arabidopsis thaliana*, uma planta sexuada, têm sido descritas mutações que afetam o balanço entre o desenvolvimento do embrião e endosperma e, desta forma, o desenvolvimento da semente ocorre independentemente de fertilização. A mutação *fie* (endosperma independente de fertilização) afeta especificamente a célula central resultando na replicação de seu núcleo e no desenvolvimento do endosperma (Ohad *et al.*, 1996). A mutação *fis* (semente independente de fertilização) controla o desenvolvimento da semente em plantas que após polinização e dupla fertilização abortariam (Chaudhury *et al.*, 1997). Segundo Preuss (1999), estas mutações são particularmente importantes porque se assemelham ao padrão de desenvolvimento encontrado em plantas que se reproduzem através de apomixia, uma forma de reprodução independente de fertilização.

A variação nos níveis de ploidia do endosperma pode ocorrer em consequência da fusão ou não dos núcleos polares (Nogler, 1984a). Stebbins & Jenkins (1939) observaram em *Crepis* endosperma  $2n$  e  $4n$  surgindo a partir de núcleos polares livres ou fundidos, o que significa que fusão de núcleos polares não é pré-requisito para atividade mitótica do endosperma.

A iniciação do endosperma nas espécies agamospérmicas pode ser completamente independente do processo de polinização, resultando em desenvolvimento autônomo do 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 se desenvolve partenogeneticamente (apomixia pseudogâmica). A maioria dos apomíticos da família Compositae tem desenvolvimento autônomo do endosperma, enquanto a maior parte dos apomíticos das famílias Gramineae e Rosaceae é pseudogâmica (Nogler, 1984a). Nas espécies pseudogâmicas o início





do desenvolvimento do endosperma requer a fertilização dos núcleos polares, o que foi confirmado através de análises citológicas de metáfases de endosperma (Hakansson, 1943; Rutishauser, 1954), observação direta da fertilização (Coe, 1953; Chao, 1980) ou através de análises eletroforéticas de esterases do endosperma em *Allium tuberosum* (Kojima & Nagato, 1992).

Nogler (1984a) afirmou que “o estudo do endosperma é ainda um dos aspectos menos conhecidos da embriologia de apomíticos gametofíticos”, sendo esta 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.

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 foi observado em *Eupatorium squalidum* (Coleman & Coleman, 1984), *Chondrilla* (Poddubnaja-Arnoldi, 1933), *Taraxacum* e *Elastotema* (Fagerlind, 1944), entre outras. No segundo estágio, os núcleos polares se fundem ou não, condição 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 observada em *Eupatorium callilepis* (Coleman & Coleman, 1984) e *E. odoratum* (Coleman, 1989).

Geralmente, todas as espécies apomíticas de um gênero apresentam o mesmo tipo de desenvolvimento do endosperma, autônomo ou pseudogâmico. Apomíticos pseudogâmicos, que dependem de pólen para a fertilização dos núcleos polares, em geral apresentam microsporogênese e formação de grãos de pólen normais ou pouco alteradas. No caso das plantas pseudogâmicas que apresentam esterilidade masculina a produção de sementes é dependente da polinização por espécies não apomíticas vizinhas (Smith, 1963; Nygren, 1950).

Em muitas espécies pseudogâmicas o embrião inicia o seu desenvolvimento somente após a iniciação do endosperma, como o que ocorre em *Hypericum perforatum* (Noack, 1939), *Ranunculus auricomus* (Rutishauser, 1954), *R. cassubicus* (Izmailow, 1967) e muitas espécies apospóricas da família Gramineae, como *Panicum maximum* (Warmke, 1954), *Pennisetum ciliare* (Snyder et al. 1955) e *P. dubium* (Gildenhuis & Brix, 1959).



Outras espécies pseudogâmicas, ainda em fase de botão apresentam desenvolvimento precoce do embrião (embrionia precoce) e, assim, a formação do embrião precede o desenvolvimento do endosperma, que ocorre somente após a fertilização do núcleo central. Alguns exemplos são *Poa* (Akerberg, 1942), *Parthenium* (Esau, 1946), entre outros. Certos gêneros apresentam uma condição transitória, apresentando espécies com ou sem embrionia precoce como *Potentilla* (Rutishauser, 1948; Smith, 1963) e *Paspalum* (Snyder, 1957; Reusch, 1961). Embrionia precoce prevalece em apomíticos autônomos, como *Hieracium* (Skalinska, 1973), *Taraxacum* (Malecka, 1971), *Eupatorium* (Bertasso-Borges & Coleman, 1998) e, neste caso, o endosperma pode iniciar seu desenvolvimento antes da antese.

### 3. Meiose e esporogênese 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 controlam a habilidade dos cromossomos para o pareamento e a localização e número de quiasmas. Outros podem limitar seus efeitos à microsporogênese ou à megasporogênese e ainda outros são expressos durante a gametogênese (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. O estudo citológico de um grande número de apomíticos demonstra que alguns apresentam microsporogênese normal, outros, diversas anormalidades ou até ausência de meiose masculina (Stebbins, 1941). No entanto, as espécies pseudogâmicas não apresentam muitas anormalidades meióticas na microsporogênese, já que a produção de sementes depende de pólen viável capaz de fertilizar o núcleo central e dar início à formação do endosperma. Segundo Stebbins (1950), as anormalidades mais marcantes de micro e megasporogênese são encontradas naquelas plantas que combinam diplosporia com desenvolvimento autônomo do endosperma, considerando que não há necessidade de fecundação dos núcleos polares.

Sullivan (1976), trabalhando com espécies norte-americanas de *Eupatorium*, afirmou que todas as plantas diplóides produziram pólen normal, de





forma e tamanho uniformes. Em contraste, a maioria das plantas triplóides e tetraplóides não produziram grãos de pólen ou os produziram mal-formados. Segundo Chaudhury (1993), fertilidade masculina requer um certo número de eventos coordenados para o desenvolvimento. Estes incluem a formação de estames e anteras do meristema vegetativo, o desenvolvimento de grãos de pólen dentro dos lóculos da antera, a liberação oportuna e deposição de pólen no estigma e, finalmente, em plantas compatíveis, a interação entre os gametas feminino e masculino que assegure fertilização. Mutações que perturbem um desses processos dão origem a uma planta com função de pólen prejudicada porém com fertilidade feminina normal. Tais mutações são descritas como *male-steriles (ms)*.

Mutantes *male-sterile* têm sido identificados em muitas plantas. Embora a maioria dos genes para esterilidade masculina e seus alelos selvagens ainda não tenham sido clonados e estudados (Aarts *et al.*, 1993), análises fenotípicas e histológicas sugerem que algumas mutações *male-sterile* afetam a diferenciação e/ou função de diversos tipos celulares da antera, incluindo aqueles no estômio, tapetum, endotécio e as camadas arquesporais e esporógenas dos primórdios da antera (Goldberg *et al.*, 1993).

Antes da meiose os microsporócitos sintetizam uma parede celular especial, composta de calose (1,3  $\beta$ -glucan). A deposição de calose é contínua durante a meiose tal que a tétrade de micrósporos também é rodeada por calose. Após o final da meiose e o início da formação da parede de exina, a calose é degradada pela calase liberando os micrósporos. Esterilidade masculina em linhagens *male sterile* de petunia (Frankel *et al.*, 1969), *Lilium* (Steiglitz & Stern, 1973) e tabaco transgênico (Worral *et al.*, 1992) tem sido atribuída à atividade precoce de calase, o que leva à dissolução prematura da parede de calose ao redor dos microsporócitos. A função da calose e sua degradação (após o final da meiose) na microsporogênese não são conhecidas, mas a existência de várias linhagens *male-sterile* nas quais o tempo de dissolução da calose é perturbado, sugere que tanto a presença da calose quanto sua degradação no tempo apropriado são essenciais para o desenvolvimento normal do pólen (Chasan, 1992).

De acordo com Gentcheff & Gustafsson (1940), os distúrbios observados durante a meiose são usualmente distintos nos óvulos e anteras da mesma espécie. As irregularidades mais freqüentes na meiose podem estar relacionadas ao comportamento e à distribuição dos cromossomos, como ausência





de pareamento e contração cromossômica e retardamento ou precocidade das divisões meióticas.

Nas espécies diplospóricas, durante a meiose feminina os cromossomos não pareados podem ocorrer espalhados sobre a placa metafásica, o que leva à formação de um núcleo de restituição (diplosporia dos subtipos *Taraxacum* e *Ixeris*). Segundo Asker & Jerling (1992), a produção de núcleos de restituição é uma das principais causas de formação de gametófitos e oosferas não reduzidas.

Em certos estágios da reprodução sexuada uma camada de calose serve para isolar as células envolvidas na formação do saco embrionário. De acordo com Rodkiewicz (1970), nas espécies sexuadas que formam gametófitos femininos monospóricos e bispóricos, durante a megasporogênese calose é depositada primeiro ao redor da parede da célula mãe de megásporos e, então, nos megásporos. A barreira de calose possivelmente atua como um filtro molecular, permitindo a passagem de nutrientes, porém isolando a célula mãe de megásporos de hormônios ou outras moléculas da nucela que possam difundir-se e interromper a meiose. Nas espécies sexuadas, quatro megásporos resultam do processo de meiose porém, usualmente, somente um é funcional. Neste a parede de calose torna-se delgada ou ausente. A permanência de calose nas paredes dos megásporos não funcionais, provavelmente, assegura que somente o megásporo funcional receba nutrientes da nucela (Reiser & Fischer, 1993).

O padrão de deposição de calose em óvulos de espécies sexuadas não é conservado durante a formação do saco embrionário apomítico. 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 demonstraram a presença de uma substancial parede de calose nas células mãe de megásporos na espécie sexuada *E. scabrus* e a ausência de tal parede na espécie apomítica *E. rectisetus*. Da mesma maneira, Leblanc *et al.* (1995) demonstraram que espécies sexuadas de *Tripsacum* apresentam uma camada de calose no megasporócito, enquanto nos megasporócitos diplospóricos esta camada é ausente.

Peel *et al.* (1997) observaram o padrão de deposição de calose em células mãe de megásporos de *Eragrostis curvula* e várias linhagens de *Tripsacum*, ambas diplospóricas, e em três espécies apospóricas – *Pennisetum ciliare*, *P.*



*squamulatum* e *Poa pratensis*. Nas espécies diplospóricas, calose foi observada em somente um de 376 pistilos pertencente a *E. curvula*, uma espécie sexuada facultativa. A ausência de calose durante a megasporogênese deve ser característica das espécies diplospóricas. Embora presente, a distribuição e a quantidade de calose observada em apomíticos apospóricos foi extremamente reduzida, possivelmente como resultado de aborto das células mãe de megásporos ou ativação precoce das células nucelares. A ausência de calose sugere que diplosporia resulta de mutações que afetam a deposição de calose, alterando o processo meiótico normal.

Segundo Koltunow (1993), estas observações podem ser representativas da formação de sacos embrionários apomíticos em geral, porém ainda não se sabe se podem ser consideradas universais. A comparação de espécies apomíticas e sexuadas sugere que calose no megasporócito é essencial para meiose e desenvolvimento normal do saco embrionário. Porém, em outras espécies, tanto sexuadas como apomíticas, a formação de uma parede ocorre durante a embriogênese, o que sugere que seja necessária para o desenvolvimento do embrião, independentemente do fato deste ser derivado de processos sexuais ou assexuais.

#### 4. Regulação genética da apomixia

Apomixia é um fenômeno controlado geneticamente. Para entendermos a regulação genética de apomixia devemos lembrar que há dois componentes principais neste fenômeno: a produção de oosferas não reduzidas e o desenvolvimento partenogenético destas oosferas. Segundo Asker (1979), diferentes genes ou grupos de genes controlam as duas modificações do ciclo sexual para se obter um ciclo apomítico. Além disso, há variação nas vias pelas quais apomíticos "evitam" a meiose reducional. 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, havendo, portanto, uma forte associação entre apomixia e poliploidia (Mogie, 1988).

Há muito tempo o *background* genético de apomixia para muitos gêneros vem sendo estudado. O recurso usual é realizar cruzamentos entre espécies apomíticas facultativas e seus parentes sexuais, seguido pelo estudo do modo de reprodução da progênie (Bedinger, 1992; Asker, 1980). De acordo com





Savidan (1990, 1992), pelo menos 95% de tais cruzamentos foram negativos ou inconclusivos, o que segundo Khush *et al.* (1994) se deve à natureza complexa das espécies apomíticas poliplóides.

Vários modelos têm sido propostos para a regulação genética da apomixia. A maioria envolve a existência de alelos apomíticos que estariam presentes em plantas apomíticas e ausentes ou silentes em plantas sexuadas. Assim, apomixia teria surgido como resultado de mutações em um ou vários locos (Grimanelli *et al.*, 1998). Powers (1945) descreveu um modelo de regulação para diplosporia pseudogâmica em *Parthenium argentatum*, assumindo que homozigose para certos genes recessivos é pré-requisito para reprodução apomítica, que seria regulada por três genes: um controlando a produção de oosferas não reduzidas (alelos A,a), outro impedindo a fertilização de oosferas (alelos B,b) e um terceiro controlando o desenvolvimento partenogenético da oosfera (alelos C,c). Assim, apomíticos apresentariam o genótipo aabbcc.

De acordo com Liljefors (1955), a espécie apomítica tetraplóide *Sorbus aria* carrega no seu genoma A genes para apomixia, enquanto em *S. aucuparia* (diplóide) o genoma B carrega os genes correspondentes para sexualidade. Cruzamentos entre as duas espécies resultaram em triplóides e tetraplóides com as seguintes constituições genômicas: AAAA, AAAB e AAB (obrigatoriamente apomíticos); ABB (apomítico ou sexuado) e BB (sexuado). De acordo com este sistema, apomixia e sexualidade são dependentes do balanço entre os genes que controlam as duas características. Burton & Forbes (1960), após o estudo de cruzamentos entre tetraplóides sexuais e apomíticos, afirmaram que o controle da apomixia em *Paspalum notatum* se dá através de poucos genes recessivos.

A descoberta de uma planta sexuada, provavelmente um mutante, levou Taliaferro & Bashaw (1966) a investigarem a herança de aposporia em *Pennisetum ciliare*. Auto-cruzamentos desta planta (B-1s) resultaram numa progênie composta por 13 plantas sexuadas para 3 obrigatoriamente apomíticas. Quando B-1s foi cruzada com 2 cultivares obrigatoriamente apomíticos, os híbridos F<sub>1</sub> estavam numa proporção 5:3 (5 plantas sexuadas para 3 apomíticas). Os dados sugerem que a reprodução nesta espécie é controlada por um sistema de 2 genes, no qual B condiciona sexualidade e é epistático sobre A, que controla apomixia. Assim, os genótipos de plantas apomíticas e sexuadas seriam Aabb e AaBb, respectivamente.

Estudos em várias espécies indicam que aposporia está sob controle gênico dominante. Nogler (1975, 1982, 1984b, 1986) analisou a herança da aposporia no complexo *Ranunculus auricomus* através de cruzamentos entre a espécie sexuada diplóide *R. cassubicifolius* ( $A^+A^+$ ) e a espécie apospórica tetraplóide *R. megacarpus* ( $A^+A^+A^-A^-$ ), concluindo que a indução de sacos embrionários apospóricos é controlada por 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 para  $A^+$ . Nos poliplóides, um aumento no número de genomas carregando  $A^+$  reduz a penetrância do  $A^-$ . O fator apospórico dominante  $A^-$  é letal em homozigose.

Em *Panicum maximum* (Savidan, 1978, 1980, 1981) todas as segregações são condizentes com um modelo genético simples para herança de aposporia. De acordo com Savidan (1992), um único gene dominante dispara uma cascata de eventos que resultam numa progênie do tipo materna. Assim, diplóides sexuais têm o genótipo  $aa$ , enquanto o alelo  $A$  condiciona aposporia. Deste modo, apomixia em *P. maximum* é dominante sobre sexualidade. O controle dominante de aposporia foi constatado também em *Poa* (Asker, 1979), complexo *Bothriochloa-Dichanthium* (D'Cruz & Reddy, 1971; Harlan *et al.*, 1964) e *Pennisetum squamulatum* (Ozias-Akins *et al.*, 1998).

De acordo com Nogler (1989), a presença do fator apospórico dominante  $A^-$  determina, qualitativamente, se o saco embrionário será apospórico ou sexuada. O grau de aposporia, ou seja, a porcentagem de óvulos com sacos embrionários apospóricos, é determinado não somente pela dosagem do gene  $A^-$ , mas também pelo tempo de indução de sacos embrionários apospóricos em relação ao desenvolvimento meiótico do saco embrionário sexuada. Assim, a indução precoce de aposporia suprime desenvolvimento meiótico e aumenta o grau de aposporia.

Segundo Koltunow (1993), os dados disponíveis até o momento sugerem que aposporia é controlada por somente alguns poucos genes com profundos efeitos no mecanismo de reprodução: direcionam uma célula somática nucelar a formar um saco embrionário sem meiose, bem como iniciar embrião e endosperma sem fertilização. Até o presente, os genes envolvidos na reprodução apospórica não foram isolados e, conseqüentemente, a identidade dos produtos dos genes e suas funções permanecem para serem elucidadas.





O controle de partenogênese ainda não é claro, sendo ainda discutido se todos os processos têm controle genético distinto ou se há apenas um único modo de regulação (Grimanelli *et al.*, 1998). Segundo Asker (1994), um modo simples de herança para apomixia facilitaria seu uso em programas de melhoramento. Mas, mesmo se há um único gene apomítico do tipo tudo-ou-nada, apomixia é um fenômeno complexo acompanhado por modificações diversas e independentes, como a formação do endosperma, tempo de desenvolvimento do saco embrionário e mudanças meióticas que devem ter regulação separada.

## 5. Influência da poliploidia e hibridização sobre apomixia

A diversidade de mecanismos que plantas apomíticas empregam para se reproduzir assexuadamente parece indicar que este processo evoluiu independentemente nos diversos grupos (Goldenberg & Shepherd, 1998). Em grande parte dos casos apomixia está associada à poliploidia e hibridização, embora tais fatores não sejam vistos como a causa direta da reprodução apomítica (Asker, 1994). Ernst (1918) sugeriu uma íntima associação entre apomixia e hibridização pois a maioria das plantas apomíticas são altamente heterozigotas. Segundo Stebbins (1950), a hibridização favorece a obtenção da combinação de genes necessária para iniciar um ciclo apomítico. Segundo Bashaw & Hanna (1990), hibridização e poliploidia acompanham apomixia e podem causar irregularidades meióticas e esterilidade.

Pamilo (1987) afirmou que a ausência de recombinação em organismos apomíticos previne rearranjos gênicos e faz com que a heterozigose no nível do indivíduo aumente, porque novas mutações se acumulam no genoma. Tal variabilidade pode ser importante na evolução adaptativa de organismos apomíticos, nos quais a flexibilidade dada pela recombinação é restringida. A alta heterozigose em apomíticos, resultante de sua freqüente origem através de hibridização, é mantida devido à infreqüência de recombinação (Campbell & Dickinson, 1990). Estudos eletroforéticos de alguns grupos de plantas sexuais e apomíticas revelaram que táxons apomíticos têm heterozigose superior a de seus parentes sexuais (Bayer & Crawford, 1986; Bayer, 1989). Entretanto, Yahara *et al.* (1991) revelaram que em *Eupatorium altissimum* não há diferença substancial em heterozigose entre plantas apomíticas e sexuais.



Apomixia gametofítica está intimamente associada à poliploidia sendo que, essencialmente, todos os apomíticos gametofíticos são poliplóides. Richards (1996) afirmou que esta associação é explicada através da expressão no gametófito feminino de genes recessivos letais ligados à genes para apomixia. Muitos destes letais se expressam no saco embrionário haplóide, mas não no saco embrionário não reduzido de espécies com apomixia gametofítica, nas quais estão protegidos da expressão numa condição heterozigota. Tais genes também se expressam em tubos polínicos haplóides inviabilizando a formação do endosperma em apomíticos pseudogâmicos diplóides. Ainda segundo este modelo, espécies que apresentam embrionia adventícia são freqüentemente diplóides porque este mecanismo de agamospermia não envolve uma geração gametofítica e, assim, os genes recessivos letais não se expressam.

Gustafsson (1947) afirmou que embora genes para apomixia possam ser encontrados em diplóides através de mutações, a ação de muitos desses genes torna-se 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, os 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 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.

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 leva à interrupção do sistema de auto-incompatibilidade e torna a reprodução sexuada facultativa. Neste gênero, espécies apomíticas diplóides não existem, mas aproximadamente 60% das espécies tetraplóides observadas são apomíticas enquanto as restantes, sexuadas. Em *Themeda australis* (Gramineae), diplóides são sexuais enquanto tetraplóides



são apomíticos facultativos (Evan & Knox, 1969). Em *T. triandra*, tetraplóides são apomíticos facultativos enquanto octaplóides e níveis maiores de ploidia são obrigatoriamente apomíticos (Birari, 1980).

## 6. Significado evolutivo da apomixia

A hipótese *escape from sterility* de Darlington (1958) afirma que a principal vantagem adaptativa de apomixia é restaurar a fertilidade dos indivíduos híbridos que, de outra forma, seriam sexualmente estéreis em consequência de poliploidia e hibridização. Porém, segundo Hignight *et al.* (1991), apomixia obrigatória tem sido considerada como “fim-de-linha” evolutivo pois, devido à ausência de recombinação, torna os indivíduos incapazes de adaptarem-se às mudanças ambientais. Em tais apomíticos, a heterozigose e o fenótipo materno são fixados e mantidos por gerações sucessivas. 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. 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 a ocorrência de hibridização que pode resultar, em poucas gerações, na formação de biótipos apomíticos bem adaptados que podem se propagar através de semente, o que é aceito também por Grant (1971) e Marshall & Brown (1981). De Wet & Stalker (1974) afirmaram que espécies apomíticas são bem adaptadas porque são facultativamente sexuadas e não porque reproduzem-se apomiticamente.

Bara (1989) relatou que espécies apomíticas facultativas são pioneiras na evolução pois combinam as vantagens da reprodução sexuada (alto grau de heterozigose) e apomixia (estabilidade relativa e reprodução fiel de genótipos bem adaptados), assegurando uma taxa elevada de evolução adaptativa. Segundo Hignight *et al.* (1991), uma população num determinado ecossistema pode ser composta de um único genótipo obrigatoriamente apomítico, o que a torna vulnerável às mudanças ambientais. Entretanto, a maioria das espécies apomíticas tem algumas plantas sexuadas ou facultativas ou ainda o potencial para fertilização de oosferas não reduzidas ( $2n+n$  = hibridização BIII), o que aumenta sua flexibilidade genética.



Evolução 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. Uma destas fontes é o fenômeno de auto-segregação (Gustafsson, 1947) que se refere à mudanças no número cromossômico da oosfera e do embrião em consequência de irregularidades meióticas durante a formação da oosfera. Lukina & Yudin (1992) relataram um exemplo de auto-segregação em híbridos de *Zea mays* x *Tripsacum dactyloides*. Neste cruzamento, usualmente, o híbrido resultante apresenta um genoma adicional do milho na oosfera não reduzida. Outra fonte assexuada de variação segundo Darlington (1958) é a reprodução subsexuada. Neste caso, embora não haja redução do número cromossômico, ocorre segregação de genes devido ao *crossing-over* durante o pareamento heterogenético mesmo que em frequências baixas, fenômeno observado em *Agropyron scabrum* (Hair, 1956). 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. Também, considerando que as plantas agamospérmicas, freqüentemente, são de origem híbrida, mesmo num nível baixo de reprodução sexuada ocorre a formação de recombinantes que se perpetuam apomiticamente.

Bierzychudek (1989) afirmou que táxons apomíticos ocupam ambientes mais variados em relação a seus parentes sexuados, o que sugere a hipótese de que apomíticos possuem *general-purpose genotypes*, ou seja, genótipos cuja performance é relativamente insensível à mudanças nas condições do ambiente. Ela testou esta hipótese usando plantas sexuadas e apomíticas de *Antennaria parvifolia* (Compositae), cultivadas em 6 câmaras distintas, com variação de temperatura e de níveis de nutrientes. Apomíticos excederam os sexuados em sobrevivência média, produção flor/capítulo e biomassa média, perdendo somente para coeficiente de variação na biomassa. Estes resultados confirmam a hipótese de que genótipos apomíticos são ecologicamente mais tolerantes do que os sexuais.

## 7. Apomixia e melhoramento vegetal

A introdução de apomixia em cultivares pode auxiliar em programas de melhoramento. Se os processos apomíticos podem ser entendidos e manuseados,





os benefícios para a agricultura são potencialmente enormes. Clones apomíticos derivados de plantas sexuadas economicamente importantes podem facilitar o desenvolvimento, a produção em massa e a manutenção de genótipos híbridos (Calzada *et al.*, 1996). Agamospermia não é muito comum em plantas de interesse econômico, sendo que os casos mais conhecidos estão entre o gênero *Citrus* (laranja, limão, etc.) e *Mangífera* (manga), embora ocorra também em pera, alcaparra, amora, maçã e em algumas gramíneas forrageiras (Richards, 1986).

Segundo Nogler (1984a), as razões para o interesse no fenômeno apomítico são óbvias. Reprodução apomítica fixa combinações gênicas heterozigotas com propriedades agronômicas valiosas como, por exemplo, genes para resistência à doenças. De acordo com Bashaw & Hanna (1990), apomixia trata-se de um método natural para clonagem de plantas através da propagação por sementes, revelando-se um dos mais interessantes e dinâmicos métodos de reprodução em vegetais. As sementes podem ser produzidas por muitas gerações sem perda de vigor ou alteração genotípica (Koltunow *et al.*, 1995).

O domínio de apomixia significa o início de uma nova era para o melhoramento vegetal e a produção de sementes, porque permite a fixação imediata de qualquer genótipo desejado. Assim, a produção de sementes e o melhoramento de plantas serão mais rápido e barato (Grossniklaus *et al.*, 1998). Se apomixia pode ser introduzida em plantas de interesse econômico torna-se um meio econômico para perpetuar um determinado genótipo, preservando sempre suas características, como heterose, através de gerações sucessivas via semente. Plantas apomíticas podem, potencialmente, ser uma fonte constante de sementes renováveis, capazes de produzir alimentos em larga escala, um traço da agricultura de grande valor particularmente para países em desenvolvimento (Koltunow, 1993).

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 (Hanna & Bashaw, 1987). Vários estudos têm sido feitos para se transferir apomixia para milho a partir de *Tripsacum*, um parente selvagem do milho, que representa uma fonte genética contra resistência a estresse biótico e abiótico e para apomixia (Hoisington *et al.*, 1999).



## 8. A família Compositae (Asteraceae) e o gênero *Eupatorium*: caracterização geral

As Compositae ou Asteraceae compreendem cerca de 1100 gêneros, com aproximadamente 25000 espécies de ampla distribuição, bem representadas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. São mais abundantes nas regiões áridas do que nas florestas tropicais úmidas. No Brasil estão representadas por aproximadamente 180 gêneros. Na grande maioria, as Compositae são espécies herbáceas, anuais ou perenes, subarbustivas ou arbustivas e, raramente, arbóreas. As folhas, na grande maioria, são alternas podendo também ser opostas (Barroso *et al.*, 1986).

A inflorescência típica das Compositae é o capítulo, constituído de uma a muitas flores, assentadas sobre um receptáculo comum cercado por brácteas involucrais. A família pode ser reconhecida com base na morfologia da flor que apresenta corolas gamopétalas, tipicamente com 5 lóbulos e a presença comum do cálice modificado em forma de *pappus*. O androceu é formado por 5 estames epipétalos, com filetes curtos ou longos, anteras unidas pelas margens, bitecas. O gineceu está constituído por um ovário ínfero, bicarpelar, unilocular, uniovulado; óvulo basal, anátropo, com um só integumento; estilete único, dividido em dois ramos, curtos ou longos, cada ramo com um estigma (Barroso *et al.*, 1986). O fruto é um aquênio que apresenta uma fina e inconspícua camada de endosperma (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, com distribuição geográfica quase cosmopolita, porém concentradas nas regiões tropicais das Américas (Montgomery & Fairbrothers, 1970). Mais 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. polystachium* recebe o nome de *Ageratina dendroides* (Sprengel) King e Robinson, *E. purpurascens*, *Campuloclinium purpurascens* (Schultz-Bip) King e Robinson e *E. laevigatum*, *Chromolaena laevigata* (Lam.) King e 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, tubulosas, hermafroditas, de cor púrpura ou branca, cujas corolas apresentam 5 lóbulos. Folhas geralmente opostas, sésseis ou pecioladas. Aquênios glabros ou pilosos. Este gênero é constituído de espécies arbustivas, sub-arbustivas ou herbáceas, perenes e raramente anuais. Apesar de bem representado na flora brasileira, o gênero é pouco pesquisado no Brasil a não ser sob o ponto de vista taxonômico.

## 9. Objetivos

Relatos de apomixia na família Compositae e, em particular, no gênero *Eupatorium*, bem como a disponibilidade de três espécies não pesquisadas nesta região estimularam esta investigação. Também estas espécies eram desconhecidas citogeneticamente no Brasil, enquanto que para uma delas, *E. laevigatum*, existiam apenas registros de número cromossômico do Equador e Argentina (King *et al.*, 1976; Watanabe *et al.*, 1995). 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 apomítico, desde que podemos supor que, nos complexos apomíticos, as espécies diplóides e sexuadas são ancestrais às poliplóides e apomíticas.

Este estudo teve por objetivo investigar o modo de reprodução e a citogenética de três espécies do gênero *Eupatorium*: *E. polystachium*, *E. purpurascens* e *E. laevigatum*, visando o esclarecimento da ocorrência ou não de apomixia, correspondendo às seguintes etapas:

- a. Megasporogênese e desenvolvimento do gametófito feminino;
- b. Estudo da microsporogênese e formação de grãos de pólen;
- c. Análise da viabilidade dos grãos de pólen;
- d. Verificação da ocorrência de polinização;

- e. Análise do cariótipo;
- f. Determinação da produção e germinabilidade de sementes.





## II. MATERIAL E MÉTODOS

A determinação botânica do material estudado foi realizada por Graziela Barroso. A região de São José do Rio Preto, local onde foram realizadas as coletas, situa-se a 468m de altitude, na latitude Sul 20° 48' 56" e longitude Oeste 49° 23' 10".

*Eupatorium polystachium* Sprengel (= *Ageratina dendroides* (Sprengel) R. King & H. Robinson), classificada na Secção Heterolepis, é espécie arbustiva podendo medir até 3 metros de altura, não-invasora, de hábito perene com reprodução por sementes. As folhas são opostas, ovais ou lanceoladas. Os capítulos são pequenos, contendo de 4 a 5 flores usualmente de coloração branca, em inflorescências terminais. Habita brejos e lugares úmidos desde o Piauí até o Paraná. O material utilizado nesta investigação foi coletado de populações naturais na estrada de acesso em terra à Mirassolândia, município de Mirassol, SP (Figura 1).

*Eupatorium purpurascens* Schultz-Bip (= *Campuloclinium purpurascens* (Schultz-Bip) R. King & H. Robinson), classificada na Secção Campuloclinium, é planta perene, herbácea podendo alcançar até 1,20 metros de altura, de caule pubescente. As folhas são opostas, ovais, agudas e pubescentes. Os corimbos são largos e os capítulos contêm em média 40 flores. A corola é glabra, mede até 6 mm, de coloração púrpura. Habita os estados de Goiás e São Paulo. O material utilizado nesta investigação foi coletado de populações naturais nos municípios de Mirassol e São José do Rio Preto, SP (Figura 2).

*Eupatorium laevigatum* Lam. (= *Chromolaena laevigata* (Lam.) R. King & H. Robinson), classificada na Secção Osmia, é planta perene, arbustiva, pouco ramificada, ereta, de caules sulcados e glabros, medindo até 2 metros de altura. As folhas são ovais, com a base cuneiforme, glabras, reticulado-venosas. As inflorescências são terminais e axilares, com os capítulos contendo de 15 a 20 flores azuis claras ou brancacentas. De acordo com Lorenzi (1991), é uma planta daninha largamente espalhada por todo o país, infestando principalmente pastagens, linhas de cerca, beiras de estradas e terrenos abandonados. O material utilizado neste trabalho foi coletado de populações naturais na estrada de acesso em terra à Mirassolândia, município de Mirassol, SP (Figura 3).

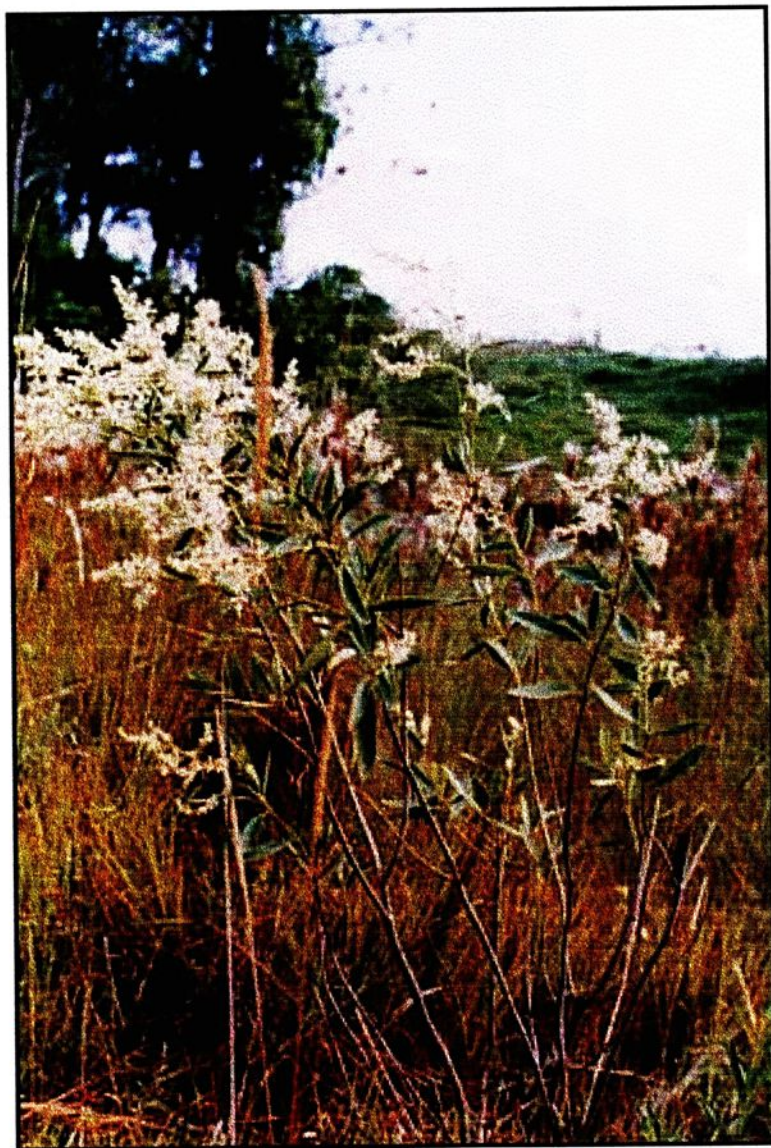


Figura 1. *Eupatorium polystachium*





Figura 2. *Eupatorium purpurascens*



Figura 3. *Eupatorium laevigatum*



Para o estudo de megasporogênese e desenvolvimento do saco embrionário, botões florais em várias fases de desenvolvimento, bem como flores abertas, foram fixados em F.A.A. (Johansen, 1940; apêndice, página 119) e mantidos sob refrigeração. Os óvulos foram retirados dos ovários sob lupa com auxílio de estiletos e colocados em solução clarificadora (Herr, 1971, 1972, 1982; apêndice, página 119) durante 24 horas. Após a clarificação, foram transferidos para uma lâmina contendo meio de Hoyer (Alexopoulos & Benke, 1952; apêndice, página 120) cobertos por lamínula e, então, levados ao microscópio para análise e seleção para fotografias.

Com a finalidade de se verificar a etapa de desenvolvimento embriológico, observou-se óvulos de flores em três fases de desenvolvimento: iniciais, pré-antese e antese. Foram considerados em pré-antese os botões florais com os estigmas ainda contidos no botão, estimados estarem dentro de 24 horas antes da antese. A antese caracteriza-se pela exposição dos estigmas. Os resultados obtidos foram analisados quanto à ocorrência das diferentes etapas embriológicas nas três fases de desenvolvimento floral.

Para o estudo de microsporogênese, botões florais em diversas fases de desenvolvimento foram fixados em solução de Carnoy (apêndice, página 119) durante 24 horas, transferidos para álcool 70% e mantidos sob refrigeração. A microsporogênese foi estudada pela técnica de esmagamento (Darlington & La Cour, 1970) que envolve a retirada das anteras sob lupa em álcool 70% que, em seguida, é absorvido por papel de filtro. Sobre as anteras coloca-se carmim acético (apêndice, página 119) e, então, realiza-se a maceração das mesmas com auxílio de uma espátula, sendo retirado o excesso do material visível a olho nu. A seguir, o material é coberto com lamínula e aquecido levemente, com a finalidade de clarear o citoplasma. Se fases desejadas são observadas ao microscópio é aplicada pressão à lâmina, com a lamínula voltada para baixo, sobre papel toalha. Em seguida, a lamínula é levantada, sobre o material é colocada uma gota de meio de Hoyer e, então, é recolocada a lamínula.

Para os estudos de cariótipo, as 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 (apêndice, página 119) a uma temperatura de  $15 \pm 3^\circ\text{C}$ , 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, foram coradas com carmim acético por 30 minutos. Depois, a região terminal da raiz foi removida e colocada em lâmina com uma gota de meio de Hoyer. O meristema apical foi raspado com auxílio de estilete e coberto por lamínula para observação ao microscópio. Quando fases desejadas foram encontradas, aplicou-se pressão sobre a lamínula com auxílio de alicate para achatar as células e espalhar os cromossomos. Metáfases favoráveis foram fotografadas. Medidas feitas do comprimento total de cada cromossomo e dos braços longo e curto permitiram o cálculo da proporção de braços. Baseado na análise destas medidas foi determinado o cariótipo básico das três espécies. Os cromossomos foram classificados de acordo com a proposta de Levan *et al.* (1964), na qual os cromossomos são designados conforme a posição do centrômero: (M) e (m) para mediano, (M) com proporção de 1,00 e (m) para a proporção de 1,01 a 1,70; (sm) para submediano, com a proporção de 1,71 a 3,00; (st) para subterminal, com a proporção de 3,01 a 7,0 e (t) para terminal, com relação acima de 7,0.

Para o estudo da ocorrência e frequência de polinização, os estigmas foram retirados de flores em fase de antese previamente fixadas em Carnoy, corados em carmim acético durante 24 horas e, em seguida, montados em lâmina em meio de Hoyer. A análise envolveu a contagem de grãos de pólen aderidos à superfície estigmática. O estudo da viabilidade dos grãos de pólen se baseou na coloração de grãos de pólen, retirados de anteras em fase de pré-antese, no corante azul de algodão-lactofenol (apêndice, página 120). Foram considerados grãos inviáveis aqueles que não ficaram plenamente corados e os de tamanho reduzido.

Para o estudo da germinabilidade as sementes foram semeadas sobre papel de filtro umedecido em placas de Petri e colocadas para germinar à temperatura ambiente. O número de sementes que germinava diariamente 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 em inflorescências representativas de determinadas plantas o número de flores que produziram sementes, obtendo-se, deste modo, a porcentagem de produção de sementes para cada espécie.

Os filmes usados para as fotografias foram o COPEX PAN AHU PET 13 P e KODAK *imagelink*™ HQ. O papel fotográfico empregado foi o Kodabrome Print R C F<sub>3</sub>. Os equipamentos ópticos utilizados foram um estereomicroscópio Zeiss





SRBr e um fotomicroscópio Zeiss Standard WL equipado com contraste de fase, com sistema fotográfico MC-63 automático acoplado.

### III. RESULTADOS

#### 1. *Eupatorium polystachium*

##### 1.1 Embriologia

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

Foram analisadas 5 plantas desta espécie, tendo sido examinados um total de 1620 óvulos. Destes, 845 foram provenientes de flores em fases iniciais de desenvolvimento, 227 em pré-antese e 548 em antese. As etapas embriológicas encontradas nos óvulos de *E. polystachium* nas diferentes fases de desenvolvimento floral estão apresentadas na Tabela 1.

A análise dos óvulos revelou a presença de megasporócitos (Figura 4a), díades e tétrades (Figura 4b) de megásporos, sacos embrionários uninucleados (Figura 4c), binucleados (Figura 4d) e tetranucleados (Figura 5a), oosfera/núcleos polares (Figura 5b), oosfera/núcleo central (Figura 5c), embrião/núcleo central, embrião/endosperma (Figura 5d) além de sacos embrionários abortados.

De 845 óvulos examinados nas fases iniciais de desenvolvimento floral 6,51% (55) corresponderam a megasporócitos, 2,13% (18) a díades e 6,39% (54) a tétrades de megásporos. 7,69% (65) dos óvulos analisados correspondem a sacos embrionários uninucleados, 9,35% (79) a sacos embrionários binucleados e 13,14% (111) a sacos embrionários tetranucleados. A proporção de oosfera/núcleos polares (7,69%) foi maior nesta fase em relação às demais, enquanto a proporção de oosfera/núcleo central (43,67%) foi menor quando comparada às demais. A presença de embrião/núcleo central e embrião/endosperma não foi constatada nesta fase. A proporção de sacos embrionários abortados foi de 3,43%.

Dos 227 óvulos examinados na fase de pré-antese não foi constatada a presença de megasporócitos, díades e tétrades de megásporos, sacos embrionários uninucleados e binucleados, sendo possível observar uma diminuição acentuada na proporção de sacos embrionários tetranucleados (0,44%) e



oosfera/núcleos polares (0,44%) em relação à fase floral anterior. Oosfera/núcleo central correspondeu a 96,92% (220) dos óvulos examinados e em nenhum deles foi constatada a presença de embrião/núcleo central e embrião/endosperma. A proporção de sacos embrionários abortados foi de 2,20%.

Dos 548 óvulos analisados na fase de antese não foi observada a presença dos estágios iniciais de desenvolvimento do saco embrionário (megasporócitos, díades e tétrades de megásporos, sacos embrionários uninucleados e binucleados). A proporção de sacos embrionários tetranucleados e oosfera/núcleos polares foi muito pequena (0,18%). Oosfera/núcleo central correspondeu a 66,06% (362), enquanto embrião/núcleo central, 2,74% (15) e embrião/endosperma, 28,47% (156). A proporção de sacos embrionários abortados foi de 2,37%. 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 possibilitando, deste modo, a polinização.

A análise do conteúdo dos óvulos clarificados em fases iniciais de desenvolvimento floral revelou a presença de um megasporócito (Figura 4a) que sofre uma primeira divisão meiótica para formar uma díade, a qual rapidamente sofre uma segunda divisão meiótica para produzir uma tétrade de megásporos (Figura 4b). O megásporo da região chalazal é funcional e aumenta de tamanho esmagando os três megásporos da região micropilar, formando o saco embrionário uninucleado (Figura 4c). O saco embrionário continua a se alongar ocorrendo uma divisão mitótica, o que resulta no saco embrionário binucleado (Figura 4d). A seguir, uma segunda divisão mitótica dá origem ao saco embrionário tetranucleado (Figura 5a). Estes núcleos ao sofrerem uma terceira divisão produzem o saco embrionário maduro, com 8 núcleos, composto por duas sinérgides, uma oosfera, dois núcleos polares (Figura 5b) e três antípodas. O saco embrionário, portanto, é do tipo *Polygonum*, o que é típico para a família (Davis, 1966). As sinérgides e as antípodas degeneram, resultando em um saco embrionário com a oosfera e os dois núcleos polares. Os núcleos polares regularmente se fundem para formar o núcleo central (Figura 5c). A oosfera invariavelmente permanece até a antese ainda sem se dividir (Tabela 1), excluindo a possibilidade de embrionia precoce que tem sido observada na maioria das espécies apomíticas do gênero 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 ocorrência de embrião e endosperma (Figura 5d). A presença de embrião e endosperma foi constatada apenas em óvulos de flores já abertas e, assim, com possibilidade de terem sido polinizadas.





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

|                           | Estágio Floral |       |            |       |        |       |
|---------------------------|----------------|-------|------------|-------|--------|-------|
|                           | Fase Inicial   |       | Pré-Antese |       | Antese |       |
| Plantas examinadas        | 5              |       | 5          |       | 5      |       |
| Óvulos analisados         | 845            |       | 227        |       | 548    |       |
| Conteúdo                  | Nº             | %     | Nº         | %     | Nº     | %     |
| S. embrionário abortado   | 29             | 3,43  | 5          | 2,20  | 13     | 2,37  |
| Megasporócito             | 55             | 6,51  | 0          | 0     | 0      | 0     |
| Díade de megásporos       | 18             | 2,13  | 0          | 0     | 0      | 0     |
| Tétrade de megásporos     | 54             | 6,39  | 0          | 0     | 0      | 0     |
| S. embrionário 1-nucleado | 65             | 7,69  | 0          | 0     | 0      | 0     |
| S. embrionário 2-nucleado | 79             | 9,35  | 0          | 0     | 0      | 0     |
| S. embrionário 4-nucleado | 111            | 13,14 | 1          | 0,44  | 1      | 0,18  |
| Oosfera/núcleos polares   | 65             | 7,69  | 1          | 0,44  | 1      | 0,18  |
| Oosfera/núcleo central    | 369            | 43,67 | 220        | 96,92 | 362    | 66,06 |
| Embrião/núcleo central    | 0              | 0     | 0          | 0     | 15     | 2,74  |
| Embrião/endosperma        | 0              | 0     | 0          | 0     | 156    | 28,47 |

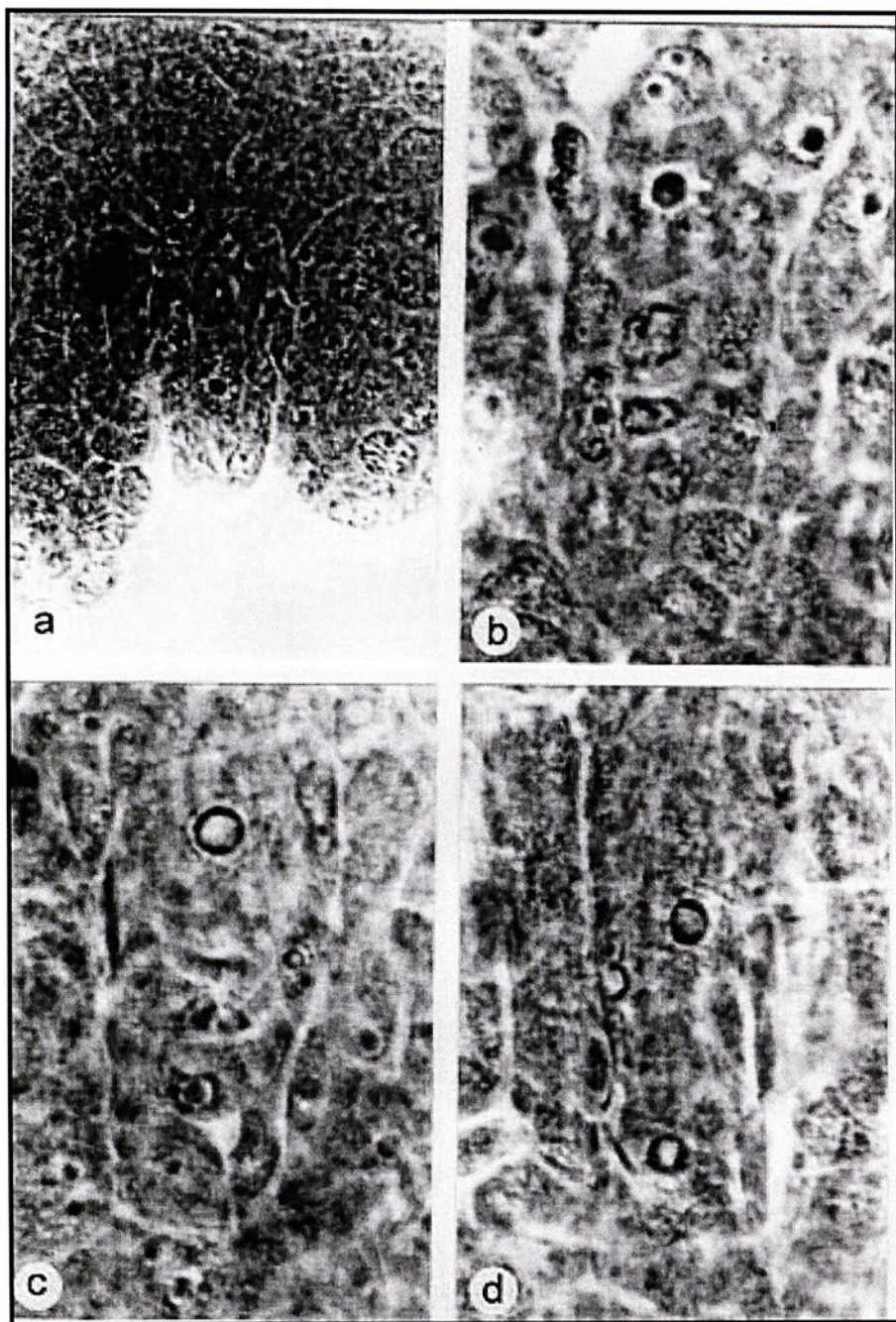


Figura 4. Formação do saco embrionário em *Eupatorium polystachium*. a, Megasporócito; b, Tétrade de megásporos; c, Saco embrionário uninucleado; d, Saco embrionário binucleado. a, 250x; b, 1375x; c, 1250x; d, 1025x



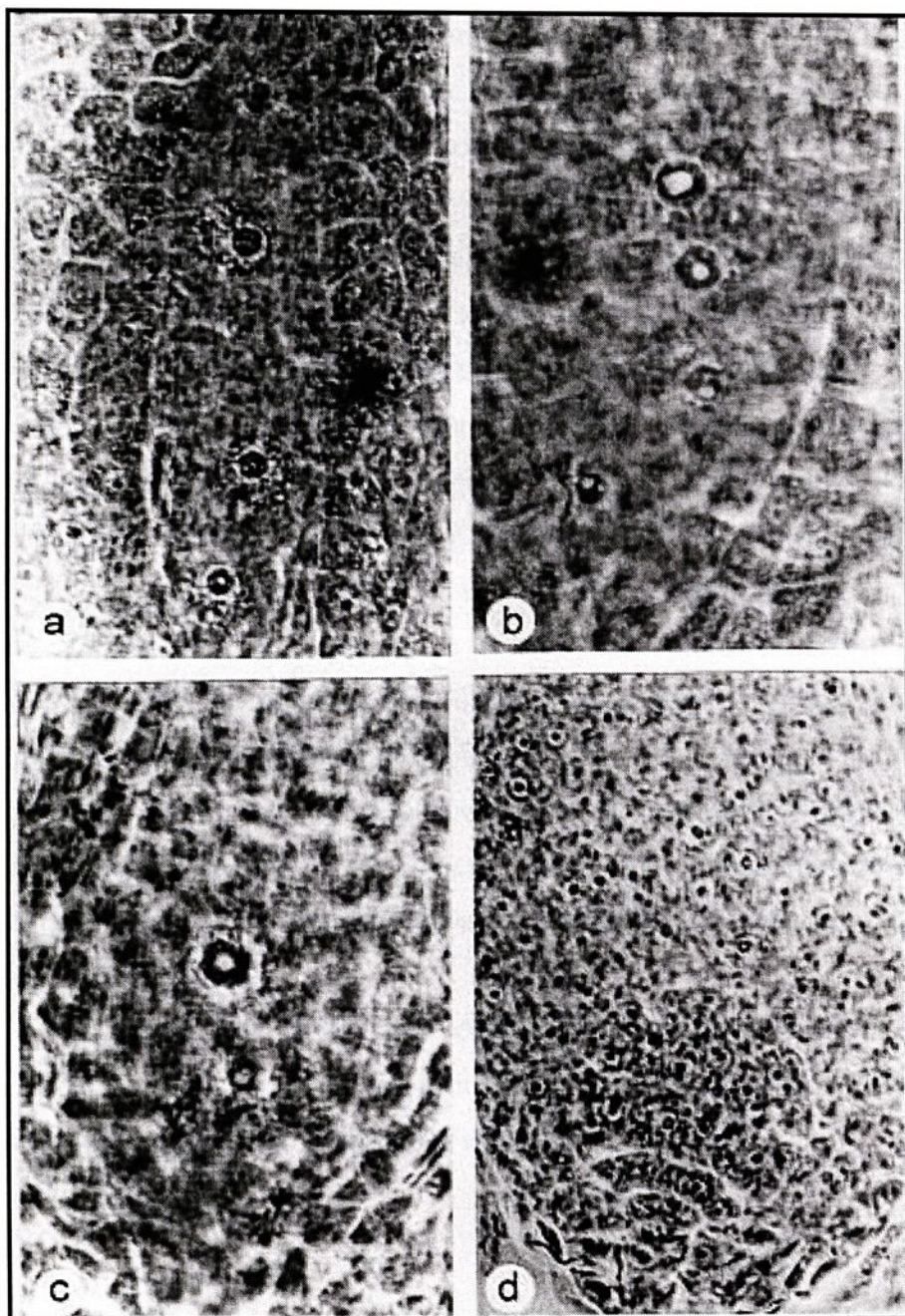


Figura 5. Formação do saco embrionário e do embrião em *Eupatorium polystachium*. a, Saco embrionário tetranucleado; b, Saco embrionário com uma sinérgide, oosfera e dois núcleos polares; c, Saco embrionário com oosfera e núcleo central; d, Embrião (fase globular) e endosperma. a, 1000x; b, 1075x; c, 520x; d, 330x

## 1.2 Microsporogênese e viabilidade do pólen

O estudo da microsporogênese e formação de grãos de pólen em *Eupatorium polystachium* envolveu a análise de 5 plantas a partir de populações naturais. Os resultados mostram que os microsporócitos, em fase de meiose, apresentam cromossomos estendidos e, aparentemente, pareados durante paquíteno. A normalidade de pareamento é bastante evidente em diacinese. Foram analisadas 99 células em diacinese, todas apresentando pareamento normal, sendo possível observar a presença de 10 bivalentes ( $2n=20$ ) (Figura 6a). A separação dos homólogos ocorre normalmente, sendo possível observar anáfase I com 10 cromossomos em cada um dos pólos (Figura 6b). A análise de 50 células em anáfase I demonstrou que nenhuma apresentou cromossomos retardatários. A segunda divisão da meiose (Figura 6c) produz, regularmente, tétrades de micrósporos (Figura 6d). A partir de 5 plantas, 200 tétrades foram analisadas, sendo que nenhuma apresentou micrósporos supernumerários. O micrósporo uninucleado sofre mitose resultando em dois núcleos que se afastam um do outro dando origem às células vegetativa e generativa. Em seguida, a célula generativa sofre uma segunda mitose dando origem aos dois núcleos generativos. Nesta espécie os grãos de pólen são liberados na condição trinucleada, o que é típico para a família (Davis, 1966).

Os dados de viabilidade dos grãos de pólen foram obtidos pela contagem de 2500 grãos de pólen a partir de 5 plantas e revelaram que 99,68% se mostraram corados e, portanto, viáveis (Figura 6e, Tabela 2).



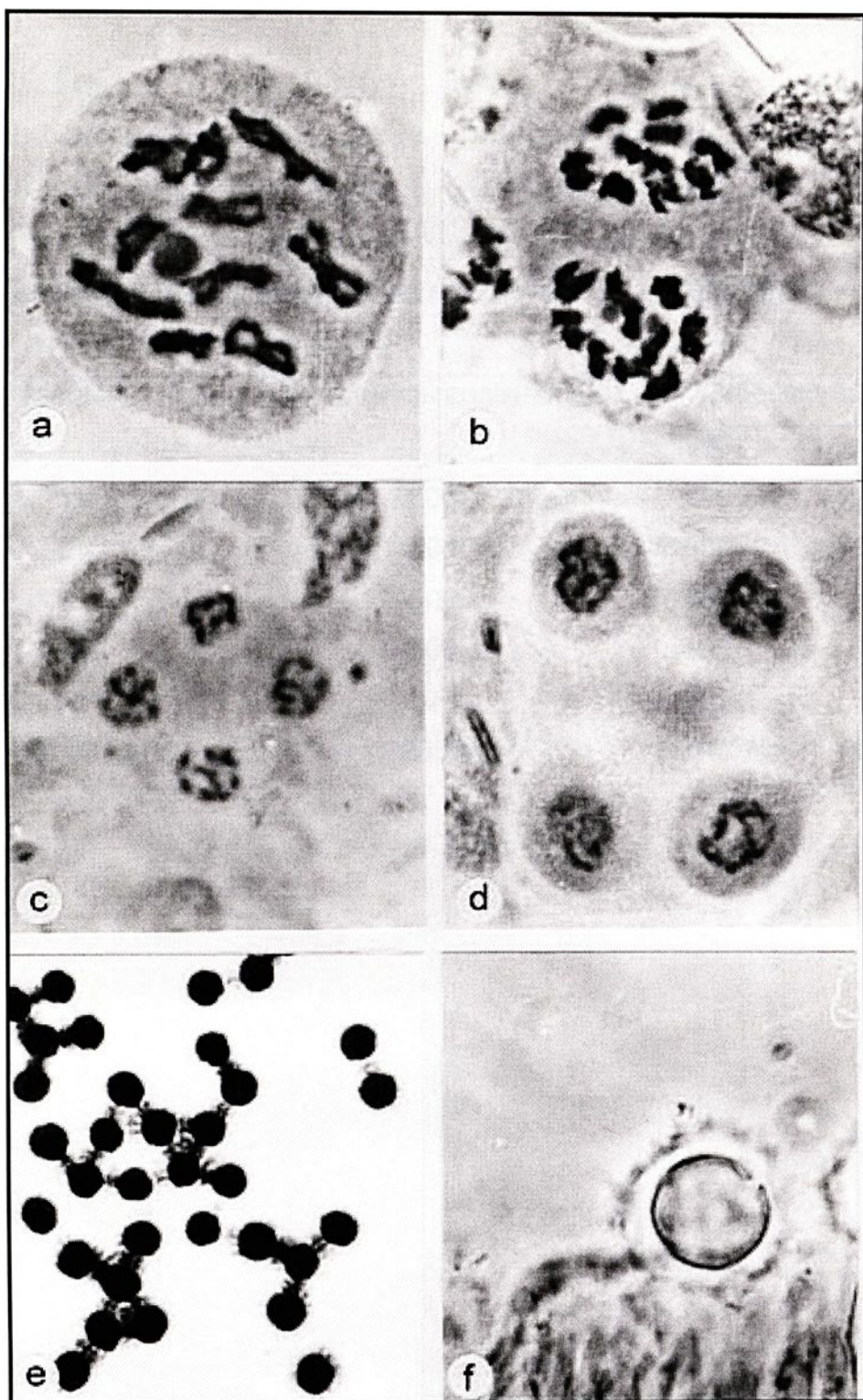


Figura 6. Microsporogênese em *Eupatorium polystachium*. a, Diacinese mostrando 10 bivalentes; b, Anáfase I com 10 cromossomos em cada um dos pólos; c, Telófase II; d, Tétrade de micrósporos; e, Grãos de pólen viáveis; f, Grão de pólen germinado. a,b, 1750x; c,d, 1760x; e, 360x; f, 900x

Tabela 2. Análise da viabilidade do pólen em *Eupatorium polystachium*.

| Planta | Nº de grãos analisados | Grãos corados |       |
|--------|------------------------|---------------|-------|
|        |                        | Nº            | %     |
| 1      | 500                    | 499           | 99,8  |
| 2      | 500                    | 500           | 100,0 |
| 3      | 500                    | 498           | 99,6  |
| 4      | 500                    | 495           | 99,0  |
| 5      | 500                    | 500           | 100,0 |
| Total  | 2500                   | 2492          | 99,68 |



1.3 Ocorrência de polinização

Estudos complementares sobre a ocorrência de polinização envolveram contagens do número de grãos de pólen sobre estigmas de *Eupatorium polystachium*. Os resultados apontam um grande número de grãos de pólen sobre a superfície estigmática. Em muitos estigmas foi possível observar a presença de tubo polínico indicando que ocorreu germinação do pólen (Figura 6f). Foram estudadas 5 plantas, num total de 173 pistilos examinados, sendo que 91,33% dos pistilos analisados apresentavam grãos de pólen, numa média de 20,06 grãos por pistilo, como indicado na Tabela 3. Uma análise de 826 grãos de pólen germinados demonstrou que todos os grãos apresentaram-se desprovidos de núcleos, indicando que os núcleos masculinos foram liberados através do tubo polínico.

Tabela 3. Ocorrência de grãos de pólen em estigmas de *Eupatorium polystachium*.

| Planta | Nº de pistilos<br>examinados | Pistilos com grãos |        | Grãos por pistilo |       |
|--------|------------------------------|--------------------|--------|-------------------|-------|
|        |                              | Nº                 | %      | variação          | média |
| 1      | 30                           | 28                 | 93,33  | 1-73              | 19,40 |
| 2      | 32                           | 31                 | 96,87  | 1-76              | 18,75 |
| 3      | 37                           | 27                 | 72,97  | 1-69              | 11,89 |
| 4      | 36                           | 36                 | 100,00 | 1-93              | 24,50 |
| 5      | 38                           | 36                 | 94,73  | 1-112             | 25,44 |
| Total  | 173                          | 158                | 91,33  | 1-112             | 20,06 |



## 1.4 Cariótipo

De acordo com Stebbins (1971), cinco características devem ser observadas quando se estuda um cariótipo: a) diferenças no tamanho absoluto dos cromossomos; b) diferenças na posição do centrômero; c) diferenças no tamanho relativo dos cromossomos; d) diferenças no número cromossômico básico; e) diferenças no número e posição dos satélites. A análise do cariótipo em *Eupatorium polystachium* foi realizada em oito metáfases, cada uma representando uma plântula. A Figura 7a apresenta uma destas metáfases. As medidas cromossômicas de cada uma das oito metáfases incluindo braços longo e curto, comprimento total dos braços, proporção dos braços e comprimento relativo do cromossomo em relação ao comprimento total do complemento cromossômico estão apresentadas nas Tabelas 4 a 11. Com base nestas medidas foi possível reunir os 20 cromossomos do complemento em 10 grupos, cada grupo contendo dois cromossomos, indicando ser o complemento cromossômico constituído de um único genoma representado duas vezes. A Figura 7b apresenta o complemento cromossômico de uma das oito metáfases analisadas, com os cromossomos presumivelmente homólogos agrupados. O ideograma está representado na Figura 7c.

A Tabela 12 caracteriza o genoma da espécie e foi baseada nas médias dos valores obtidos da análise das oito metáfases. Assim, os valores de cada cromossomo, nesta tabela, representam 16 cromossomos considerados equivalentes, 2 de cada uma das oito metáfases. O braço longo variou de 2,00  $\mu\text{m}$  (cromossomo 10) a 3,36  $\mu\text{m}$  (cromossomo 2); o braço curto de 0,83  $\mu\text{m}$  (cromossomo 7) a 2,07  $\mu\text{m}$  (cromossomo 4) e o comprimento total cromossômico de 3,59  $\mu\text{m}$  (cromossomo 10) a 4,93  $\mu\text{m}$  (cromossomo 1). Quanto à proporção entre os braços os valores extremos foram 1,10 (cromossomo 4) e 3,37 (cromossomo 7) e para o comprimento relativo, 8,83 (cromossomo 10) e 12,12 (cromossomo 1). O comprimento total do genoma foi de 40,68  $\mu\text{m}$ .

Nas Tabelas 4 a 11 a ordenação dos cromossomos foi baseada no comprimento cromossômico. 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.

Pela análise do cariótipo observa-se 7 pares de cromossomos medianos (1, 3, 4, 5, 8, 9 e 10), 1 par submediano (2) e dois pares subterminais (6 e





7). Apenas em uma das metáfases analisadas foi possível visualizar a presença de cromossomos SAT (célula 1). Os satélites, em número de dois, ocorrem no cromossomo 6 (Figura 7).



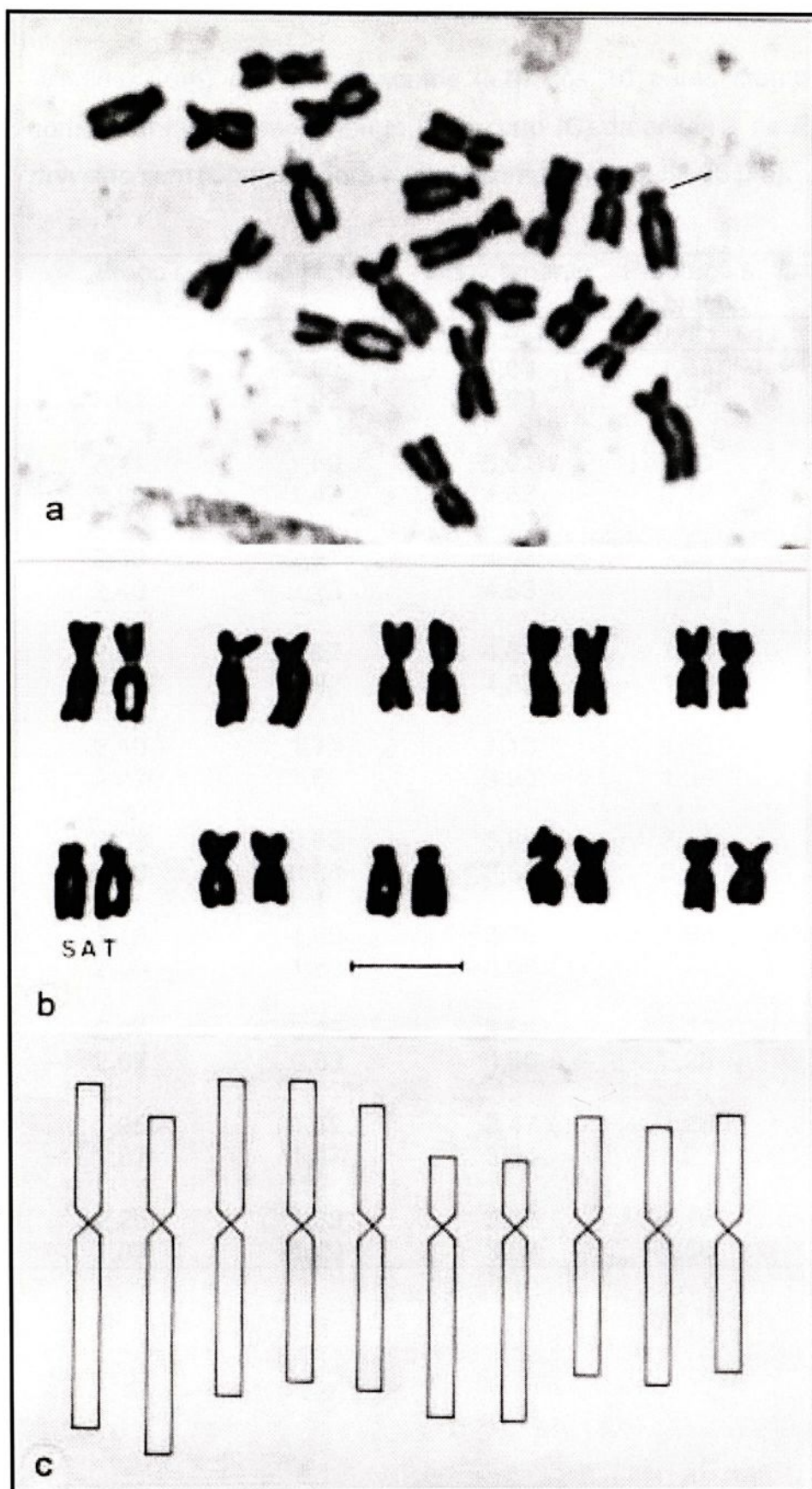


Figura 7. Cromossomos mitóticos de *Eupatorium polystachium*. a, Célula mitótica em metáfase mostrando 20 cromossomos; b, Cariótipo; c, Ideograma. Escala representa 5  $\mu$ m; linhas indicam satélites.



Tabela 4. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 1 de *Eupatorium polystachium* (Comprimento total do complemento: 85,96  $\mu\text{m}$ ).

| Par  | Braço cromossômico |      | Comprimento total<br>(L+C) | Proporção de braços<br>(L/C) | Comprimento relativo<br>% |
|------|--------------------|------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|
|      | (L)                | (C)  |                            |                              |                           |
| 1 a  | 2,93               | 2,00 | 4,93                       | 1,47                         | 6,08                      |
| b    | 3,01               | 1,92 | 4,93                       | 1,57                         | 6,08                      |
| 2 a  | 3,41               | 1,60 | 5,01                       | 2,13                         | 6,18                      |
| b    | 3,20               | 1,47 | 4,67                       | 2,18                         | 5,76                      |
| 3 a  | 2,40               | 2,27 | 4,67                       | 1,06                         | 5,76                      |
| b    | 2,40               | 2,13 | 4,53                       | 1,13                         | 5,58                      |
| 4 a  | 2,67               | 1,87 | 4,54                       | 1,43                         | 5,60                      |
| b    | 2,43               | 1,92 | 4,37                       | 1,28                         | 5,39                      |
| 5 a  | 2,40               | 1,73 | 4,13                       | 1,38                         | 5,09                      |
| b    | 2,27               | 1,63 | 3,90                       | 1,39                         | 4,81                      |
| 6 a  | 2,93               | 0,93 | 3,86                       | 3,14                         | 4,76                      |
| b    | 2,80               | 0,88 | 3,68                       | 3,18                         | 4,54                      |
| 7 a  | 2,16               | 1,60 | 3,76                       | 1,35                         | 4,63                      |
| b    | 2,03               | 1,60 | 3,63                       | 1,27                         | 4,47                      |
| 8 a  | 2,67               | 0,85 | 3,52                       | 3,13                         | 4,34                      |
| b    | 2,67               | 0,83 | 3,50                       | 3,23                         | 4,31                      |
| 9 a  | 1,95               | 1,52 | 3,47                       | 1,28                         | 4,28                      |
| b    | 1,87               | 1,47 | 3,34                       | 1,27                         | 4,12                      |
| 10 a | 2,29               | 1,33 | 3,62                       | 1,72                         | 4,46                      |
| b    | 1,87               | 1,20 | 3,07                       | 1,56                         | 3,78                      |

Tabela 5. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 2 de *Eupatorium polystachium* (Comprimento total do complemento: 71,47  $\mu\text{m}$ ).

| Par  | Braço cromossômico |      | Comprimento total<br>(L+C) | Proporção de braços<br>(L/C) | Comprimento relativo<br>% |
|------|--------------------|------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|
|      | (L)                | (C)  |                            |                              |                           |
| 1 a  | 3,39               | 2,08 | 5,47                       | 1,63                         | 6,36                      |
| b    | 3,09               | 1,95 | 5,04                       | 1,59                         | 5,86                      |
| 2 a  | 3,73               | 1,47 | 5,20                       | 2,55                         | 6,05                      |
| b    | 3,33               | 1,47 | 4,80                       | 2,27                         | 5,58                      |
| 3 a  | 2,67               | 2,13 | 4,80                       | 1,25                         | 5,58                      |
| b    | 2,67               | 2,00 | 4,67                       | 1,33                         | 5,43                      |
| 4 a  | 2,48               | 2,13 | 4,61                       | 1,16                         | 5,36                      |
| b    | 2,32               | 2,00 | 4,32                       | 1,16                         | 5,03                      |
| 5 a  | 2,43               | 1,76 | 4,19                       | 1,38                         | 4,87                      |
| b    | 2,40               | 1,73 | 4,13                       | 1,38                         | 4,80                      |
| 6 a  | 3,23               | 0,93 | 4,16                       | 3,46                         | 4,84                      |
| b    | 2,93               | 0,80 | 3,73                       | 3,67                         | 4,34                      |
| 7 a  | 2,29               | 1,81 | 4,10                       | 1,26                         | 4,77                      |
| b    | 2,19               | 1,73 | 3,92                       | 1,26                         | 4,56                      |
| 8 a  | 2,27               | 1,73 | 4,00                       | 1,31                         | 4,65                      |
| b    | 2,16               | 1,73 | 3,89                       | 1,25                         | 4,53                      |
| 9 a  | 2,93               | 0,93 | 3,86                       | 3,14                         | 4,49                      |
| b    | 2,67               | 0,93 | 3,60                       | 2,87                         | 4,19                      |
| 10 a | 2,27               | 1,60 | 3,87                       | 1,42                         | 4,50                      |
| b    | 2,13               | 1,47 | 3,60                       | 1,45                         | 4,19                      |



Tabela 6. Medidas (µm) dos cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 3 de *Eupatorium polystachium* (Comprimento total do complemento: 84,63 µm).

| Par  | Braço cromossômico |      | Comprimento total | Proporção de braços | Comprimento relativo |
|------|--------------------|------|-------------------|---------------------|----------------------|
|      | (L)                | (C)  |                   |                     |                      |
| 1 a  | 2,83               | 1,73 | 4,56              | 1,63                | 6,38                 |
| b    | 2,67               | 1,73 | 4,40              | 1,54                | 6,16                 |
| 2 a  | 2,80               | 1,20 | 4,00              | 2,33                | 5,60                 |
| b    | 2,77               | 1,20 | 3,97              | 2,31                | 5,55                 |
| 3 a  | 2,13               | 1,87 | 4,00              | 1,14                | 5,60                 |
| b    | 1,92               | 1,87 | 3,79              | 1,03                | 5,30                 |
| 4 a  | 1,92               | 1,65 | 3,57              | 1,16                | 5,00                 |
| b    | 1,89               | 1,65 | 3,54              | 1,15                | 4,95                 |
| 5 a  | 2,13               | 1,47 | 3,60              | 1,45                | 5,04                 |
| b    | 2,00               | 1,41 | 3,41              | 1,42                | 4,77                 |
| 6 a  | 2,53               | 0,99 | 3,52              | 2,57                | 4,93                 |
| b    | 2,53               | 0,96 | 3,49              | 2,64                | 4,88                 |
| 7 a  | 2,13               | 1,60 | 3,73              | 1,33                | 5,22                 |
| b    | 1,83               | 1,33 | 3,14              | 1,36                | 4,39                 |
| 8 a  | 1,76               | 1,57 | 3,33              | 1,12                | 4,66                 |
| b    | 1,73               | 1,49 | 3,22              | 1,16                | 4,51                 |
| 9 a  | 2,40               | 0,83 | 3,23              | 2,90                | 4,52                 |
| b    | 2,29               | 0,83 | 3,12              | 2,77                | 4,36                 |
| 10 a | 1,87               | 1,07 | 2,94              | 1,75                | 4,11                 |
| b    | 1,79               | 1,12 | 2,91              | 1,60                | 4,07                 |

Tabela 7. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 4 de *Eupatorium polystachium* (Comprimento total do complemento: 88,80  $\mu\text{m}$ ).

| Par  | Braço cromossômico |      | Comprimento total<br>(L+C) | Proporção de braços<br>(L/C) | Comprimento relativo<br>% |
|------|--------------------|------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|
|      | (L)                | (C)  |                            |                              |                           |
| 1 a  | 3,73               | 1,60 | 5,33                       | 2,33                         | 6,30                      |
| b    | 3,60               | 1,68 | 5,28                       | 2,14                         | 6,24                      |
| 2 a  | 2,93               | 2,13 | 5,06                       | 1,38                         | 5,98                      |
| b    | 2,93               | 2,00 | 4,93                       | 1,47                         | 5,83                      |
| 3 a  | 2,80               | 2,05 | 4,85                       | 1,36                         | 5,73                      |
| b    | 2,56               | 2,00 | 4,56                       | 1,28                         | 5,39                      |
| 4 a  | 2,40               | 2,40 | 4,80                       | 1,00                         | 5,67                      |
| b    | 2,40               | 2,13 | 4,53                       | 1,13                         | 5,35                      |
| 5 a  | 2,40               | 1,73 | 4,13                       | 1,38                         | 4,88                      |
| b    | 2,27               | 1,73 | 4,00                       | 1,31                         | 4,73                      |
| 6 a  | 2,35               | 1,55 | 3,90                       | 1,52                         | 4,61                      |
| b    | 2,24               | 1,49 | 3,73                       | 1,50                         | 4,41                      |
| 7 a  | 2,93               | 0,93 | 3,86                       | 3,14                         | 4,56                      |
| b    | 2,75               | 0,85 | 3,60                       | 3,22                         | 4,25                      |
| 8 a  | 2,13               | 1,60 | 3,73                       | 1,33                         | 4,41                      |
| b    | 2,13               | 1,60 | 3,73                       | 1,33                         | 4,41                      |
| 9 a  | 2,93               | 0,80 | 3,73                       | 3,66                         | 4,41                      |
| b    | 2,93               | 0,80 | 3,73                       | 3,66                         | 4,41                      |
| 10 a | 2,03               | 1,60 | 3,63                       | 1,27                         | 4,29                      |
| b    | 2,00               | 1,52 | 3,52                       | 1,32                         | 4,16                      |



Tabela 8. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 5 de *Eupatorium polystachium* (Comprimento total do complemento: 81,13,  $\mu\text{m}$ ).

| Par  | Braço cromossômico |      | Comprimento total<br>(L+C) | Proporção de braços<br>(L/C) | Comprimento relativo<br>% |
|------|--------------------|------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|
|      | (L)                | (C)  |                            |                              |                           |
| 1 a  | 3,20               | 2,59 | 5,79                       | 1,24                         | 6,52                      |
| b    | 3,33               | 2,21 | 5,54                       | 1,51                         | 6,24                      |
| 2 a  | 4,05               | 1,47 | 5,52                       | 2,76                         | 6,22                      |
| b    | 3,60               | 1,57 | 5,25                       | 2,34                         | 5,91                      |
| 3 a  | 2,69               | 2,43 | 5,12                       | 1,12                         | 5,77                      |
| b    | 2,61               | 2,32 | 4,93                       | 1,13                         | 5,55                      |
| 4 a  | 2,35               | 2,32 | 4,67                       | 1,01                         | 5,26                      |
| b    | 2,32               | 2,13 | 4,45                       | 1,09                         | 5,01                      |
| 5 a  | 2,32               | 1,81 | 4,13                       | 1,28                         | 4,65                      |
| b    | 2,32               | 1,81 | 4,13                       | 1,28                         | 4,65                      |
| 6 a  | 3,25               | 1,04 | 4,29                       | 3,13                         | 4,83                      |
| b    | 2,99               | 0,93 | 3,92                       | 3,20                         | 4,41                      |
| 7 a  | 2,53               | 1,60 | 4,13                       | 1,58                         | 4,65                      |
| b    | 2,53               | 1,47 | 4,00                       | 1,73                         | 4,50                      |
| 8 a  | 2,32               | 1,60 | 3,92                       | 1,45                         | 4,41                      |
| b    | 2,32               | 1,52 | 3,84                       | 1,53                         | 4,32                      |
| 9 a  | 3,20               | 0,80 | 4,00                       | 4,00                         | 4,50                      |
| b    | 2,99               | 0,75 | 3,74                       | 4,00                         | 4,21                      |
| 10 a | 2,05               | 1,73 | 3,78                       | 1,18                         | 4,26                      |
| b    | 2,05               | 1,60 | 3,65                       | 1,28                         | 4,11                      |

Tabela 9. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 6 de *Eupatorium polystachium* (Comprimento total do complemento: 68,18  $\mu\text{m}$ ).

| Par  | Braço cromossômico |      | Comprimento total | Proporção de braços | Comprimento relativo |
|------|--------------------|------|-------------------|---------------------|----------------------|
|      | (L)                | (C)  | (L+C)             | (L/C)               | %                    |
| 1 a  | 2,72               | 1,73 | 4,45              | 1,57                | 6,53                 |
| b    | 2,48               | 1,65 | 4,13              | 1,50                | 6,06                 |
| 2 a  | 2,99               | 1,33 | 4,32              | 2,24                | 6,34                 |
| b    | 2,91               | 1,28 | 4,19              | 2,27                | 6,15                 |
| 3 a  | 2,19               | 1,92 | 4,11              | 1,14                | 6,03                 |
| b    | 2,00               | 1,81 | 3,81              | 1,10                | 5,59                 |
| 4 a  | 1,87               | 1,60 | 3,47              | 1,17                | 5,09                 |
| b    | 1,73               | 1,60 | 3,33              | 1,08                | 4,88                 |
| 5 a  | 2,05               | 1,33 | 3,38              | 1,54                | 4,96                 |
| b    | 1,92               | 1,33 | 3,25              | 1,44                | 4,77                 |
| 6 a  | 2,40               | 0,80 | 3,20              | 3,00                | 4,69                 |
| b    | 2,48               | 0,72 | 3,20              | 3,44                | 4,69                 |
| 7 a  | 1,81               | 1,25 | 3,06              | 1,45                | 4,49                 |
| b    | 1,81               | 1,20 | 3,01              | 1,51                | 4,41                 |
| 8 a  | 1,71               | 1,33 | 3,04              | 1,28                | 4,46                 |
| b    | 1,68               | 1,33 | 3,01              | 1,26                | 4,41                 |
| 9 a  | 1,65               | 1,25 | 2,91              | 1,32                | 4,27                 |
| b    | 1,65               | 1,20 | 2,85              | 1,38                | 4,10                 |
| 10 a | 2,13               | 0,69 | 2,82              | 3,08                | 4,14                 |
| b    | 2,00               | 0,64 | 2,64              | 3,13                | 3,87                 |



Tabela 10. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 7 de *Eupatorium polystachium* (Comprimento total do complemento: 75,33  $\mu\text{m}$ ).

| Par  | Braço cromossômico |      | Comprimento total<br>(L+C) | Proporção de braços<br>(L/C) | Comprimento relativo<br>% |
|------|--------------------|------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|
|      | (L)                | (C)  |                            |                              |                           |
| 1 a  | 2,80               | 1,84 | 4,64                       | 1,52                         | 6,16                      |
| b    | 2,75               | 1,76 | 4,51                       | 1,56                         | 5,99                      |
| 2 a  | 2,99               | 1,41 | 4,40                       | 2,11                         | 5,84                      |
| b    | 2,80               | 1,23 | 4,03                       | 2,28                         | 5,35                      |
| 3 a  | 2,19               | 1,95 | 4,14                       | 1,12                         | 5,50                      |
| b    | 2,13               | 1,92 | 4,05                       | 1,11                         | 5,38                      |
| 4 a  | 2,40               | 1,68 | 4,08                       | 1,43                         | 5,42                      |
| b    | 2,32               | 1,68 | 4,00                       | 1,38                         | 5,31                      |
| 5 a  | 2,13               | 1,73 | 3,86                       | 1,23                         | 5,12                      |
| b    | 2,24               | 1,55 | 3,79                       | 1,45                         | 5,03                      |
| 6 a  | 2,72               | 0,80 | 3,52                       | 3,40                         | 4,67                      |
| b    | 2,69               | 0,80 | 3,49                       | 3,36                         | 4,63                      |
| 7 a  | 2,00               | 1,47 | 3,47                       | 1,36                         | 4,61                      |
| b    | 1,81               | 1,47 | 3,28                       | 1,24                         | 4,35                      |
| 8 a  | 2,56               | 0,85 | 3,41                       | 3,00                         | 4,53                      |
| b    | 2,51               | 0,85 | 3,36                       | 2,94                         | 4,46                      |
| 9 a  | 2,00               | 1,33 | 3,33                       | 1,50                         | 4,42                      |
| b    | 2,00               | 1,33 | 3,33                       | 1,50                         | 4,42                      |
| 10 a | 2,00               | 1,33 | 3,33                       | 1,50                         | 4,42                      |
| b    | 1,92               | 1,39 | 3,31                       | 1,38                         | 4,39                      |

Tabela 11. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b) dos 10 pares cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 8 de *Eupatorium polystachium* (Comprimento total do complemento: 94,87 $\mu\text{m}$ ).

| Par  | Braço cromossômico |      | Comprimento total | Proporção de braços | Comprimento relativo |
|------|--------------------|------|-------------------|---------------------|----------------------|
|      | (L)                | (C)  | (L+C)             | (L/C)               | %                    |
| 1 a  | 3,87               | 1,73 | 5,60              | 2,23                | 5,90                 |
| b    | 3,87               | 1,60 | 5,47              | 2,42                | 5,77                 |
| 2 a  | 2,80               | 2,80 | 5,60              | 1,00                | 5,90                 |
| b    | 2,88               | 2,45 | 5,33              | 1,17                | 5,62                 |
| 3 a  | 3,25               | 2,13 | 5,39              | 1,53                | 5,68                 |
| b    | 3,20               | 1,95 | 5,15              | 1,64                | 5,43                 |
| 4 a  | 2,67               | 2,40 | 5,07              | 1,11                | 5,34                 |
| b    | 2,67               | 2,40 | 5,07              | 1,11                | 5,34                 |
| 5 a  | 3,07               | 2,13 | 5,20              | 1,44                | 5,48                 |
| b    | 2,67               | 2,13 | 4,80              | 1,25                | 5,06                 |
| 6 a  | 2,93               | 1,73 | 4,67              | 1,69                | 4,92                 |
| b    | 2,67               | 1,73 | 4,40              | 1,54                | 4,64                 |
| 7 a  | 2,48               | 1,92 | 4,40              | 1,29                | 4,64                 |
| b    | 2,40               | 1,81 | 4,21              | 1,32                | 4,44                 |
| 8 a  | 3,20               | 1,07 | 4,27              | 3,00                | 4,50                 |
| b    | 2,93               | 1,07 | 4,00              | 2,75                | 4,22                 |
| 9 a  | 3,20               | 0,99 | 4,19              | 3,24                | 4,42                 |
| b    | 3,07               | 0,93 | 4,00              | 3,29                | 4,21                 |
| 10 a | 2,40               | 1,65 | 4,05              | 1,45                | 4,27                 |
| b    | 2,40               | 1,60 | 4,00              | 1,50                | 4,22                 |



Tabela 12. Comprimento ( $\bar{x} \pm Sx$ , em  $\mu\text{m}$ ) dos braços longo (L) e curto (C) de 10 cromossomos das 8 células estudadas de *Eupatorium polystachium*. Comprimento total médio do genoma: 40,68  $\mu\text{m}$ .

| Cromossomo | L           | C           | L+C         | L/C  | L+C/40,68 | Tipo |
|------------|-------------|-------------|-------------|------|-----------|------|
| 1          | 2,97± 0,07  | 1,96 ± 0,06 | 4,93 ± 0,12 | 1,51 | 12,12     | m    |
| 2          | 3,36 ± 0,11 | 1,46 ± 0,04 | 4,82 ± 0,15 | 2,30 | 11,85     | sm   |
| 3          | 2,45 ± 0,08 | 2,02 ± 0,09 | 4,47 ± 0,16 | 1,21 | 10,99     | m    |
| 4          | 2,27 ± 0,07 | 2,07 ± 0,07 | 4,34 ± 0,13 | 1,10 | 10,67     | m    |
| 5          | 2,35 ± 0,07 | 1,69 ± 0,06 | 4,04 ± 0,12 | 1,39 | 9,93      | m    |
| 6          | 2,74 ± 0,09 | 0,91 ± 0,03 | 3,65 ± 0,11 | 3,01 | 8,97      | st   |
| 7          | 2,80 ± 0,08 | 0,83 ± 0,02 | 3,63 ± 0,09 | 3,37 | 8,92      | st   |
| 8          | 2,09 ± 0,06 | 1,52± 0,05  | 3,61 ± 0,10 | 1,39 | 8,87      | m    |
| 9          | 2,19 ± 0,09 | 1,41 ± 0,05 | 3,60 ± 0,14 | 1,55 | 8,85      | m    |
| 10         | 2,00 ± 0,06 | 1,59 ± 0,04 | 3,59 ± 0,10 | 1,26 | 8,83      | m    |

### 1.5 Produção e germinabilidade de sementes

Estudos complementares para verificar a produção de sementes foram realizados em 7 plantas de *Eupatorium polystachium* num total de 2265 ovários examinados, dos quais 748 (33,02%) produziram sementes contendo embriões, como indicado na Tabela 13.

Os resultados dos testes de germinação de sementes retiradas de 4 plantas (100 sementes por planta) revelaram porcentagens variando de 44% (44 sementes) a 54% (54 sementes). Das 400 sementes testadas, 193 (48,25%) germinaram, como indicado na Tabela 14.





Tabela 13. Produção de sementes em *Eupatorium polystachium*.

| Planta | Total de ovários<br>examinados | Sementes produzidas |       |
|--------|--------------------------------|---------------------|-------|
|        |                                | Nº                  | %     |
| 1      | 668                            | 187                 | 27,99 |
| 2      | 229                            | 119                 | 51,96 |
| 3      | 710                            | 244                 | 34,36 |
| 4      | 658                            | 198                 | 30,09 |
| Total  | 2265                           | 748                 | 33,02 |

Tabela 14. Germinabilidade de sementes em *Eupatorium polystachium* (100 sementes por planta).

| Planta | Sementes germinadas |       |
|--------|---------------------|-------|
|        | Nº                  | %     |
| 1      | 49                  | 49    |
| 2      | 54                  | 54    |
| 3      | 44                  | 44    |
| 4      | 46                  | 46    |
| Total  | 193                 | 48,25 |

## 2. *Eupatorium purpurascens*

### 2.1 Embriologia

A análise da embriologia de *Eupatorium purpurascens* envolveu o estudo de 739 óvulos provenientes de flores em fases iniciais de desenvolvimento floral, 391 em pré-antese e 627 em antese, num total de 1757 óvulos, a partir de 5 plantas. As etapas embriológicas encontradas nos óvulos de *E. purpurascens*, nas diferentes fases de desenvolvimento floral, estão apresentadas na Tabela 15. Nesta análise foi possível observar a presença de megasporócitos (Figura 8a), sacos embrionários binucleados (Figura 8b) e tetranucleados (Figura 8c), oosfera/núcleos polares (Figura 8d), oosfera/núcleo central (Figura 9a), embrião/núcleo central (Figura 9b) e embrião/endosperma (Figura 9c), além de sacos embrionários abortados.

Dos 739 óvulos examinados nas fases iniciais de desenvolvimento floral 5,27% (39) corresponderam a megasporócitos, 9,61% (71) a sacos embrionários binucleados e 14,21% (105) a sacos embrionários tetranucleados, não aparecendo os estágios de díades e tétrades de megásporos. A proporção de oosferas/núcleos polares (23,01%) foi maior nesta fase floral quando comparada às duas seguintes. Oosfera/núcleo central correspondeu a 37,62% (278) dos óvulos analisados. A proporção de embrião/núcleo central foi baixa (0,95%) em relação às outras fases. Não foi constatada a presença de embrião e endosperma. A proporção de sacos embrionários foi de 9,33%.

Dos 391 óvulos examinados na fase de pré-antese não apareceram os estágios de megasporócito, díades e tétrades de megásporos e sacos-embrionários binucleado e tetranucleado. Oosfera/núcleos polares correspondeu a 6,14% (24) e oosfera/núcleo central a 56,78% (222). Pode-se notar um aumento considerável na proporção de embrião/núcleo central e embrião/endosperma em relação à fase anterior (20,46% vs 0,95% e 4,86% vs 0%, respectivamente). A proporção de sacos embrionários abortados foi de 11,76%.

Dos 627 óvulos examinados na fase de antese não ocorreram megasporócitos, díades e tétrades de megásporos, sacos embrionários bi e tetranucleados e oosfera/núcleos polares. Uma diminuição acentuada na proporção de oosfera/núcleo central (2,07%) foi observada. Embrião/núcleo central correspondeu a 3,19% (20). Neste estágio de desenvolvimento floral a proporção de



embrião/endosperma foi bastante elevada (85,17%). A proporção de sacos embrionários abortados foi de 9,57%.

A análise de óvulos clarificados de *Eupatorium purpurascens* em fases iniciais de desenvolvimento floral revelou a presença de uma única célula arquesporial inicial que funciona diretamente como megasporócito (Figura 8a). Nas fases iniciais de desenvolvimento 739 óvulos foram examinados e em nenhum deles verificou-se a presença de díades e tétrades de megásporos, o que indica ausência de meiose reductiva. A formação do saco embrionário 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 embrionário 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 embrionário tetranucleado (Figura 8c). Posteriormente, uma terceira divisão dará origem ao saco embrionário maduro com 8 núcleos, composto de duas sinérgides, uma oosfera, dois núcleos polares e três antípodas sendo, portanto, do tipo Polygonum. As sinérgides degeneram rapidamente resultando em um saco embrionário com a oosfera e os dois núcleos polares (Figura 8d). Os núcleos polares em seguida se fundem dando origem ao núcleo central (Figura 9a). Tanto a oosfera quanto o núcleo central se dividem partenogeneticamente. Constatou-se que a formação do embrião precede à do endosperma resultando na presença de embrião e núcleo central (Figura 9b) e, a seguir, embrião e endosperma (Figura 9c). É importante ressaltar a presença de embrião e/ou endosperma em óvulos de botões fechados (fases iniciais e pré-antese).

Tabela 15. Conteúdo de óvulos de *Eupatorium purpurascens* em diferentes estágios de desenvolvimento floral.

|                           | Estágio Floral |       |            |       |        |       |
|---------------------------|----------------|-------|------------|-------|--------|-------|
|                           | Fase Inicial   |       | Pré-Antese |       | Antese |       |
| Plantas examinadas        | 5              |       | 5          |       | 5      |       |
| Óvulos analisados         | 739            |       | 391        |       | 627    |       |
| Conteúdo                  | Nº             | %     | Nº         | %     | Nº     | %     |
| S. embrionário abortado   | 69             | 9,33  | 46         | 11,76 | 60     | 9,57  |
| Megasporócito             | 39             | 5,27  | 0          |       | 0      | 0     |
| Díade de megásporos       | 0              | 0     | 0          | 0     | 0      | 0     |
| Tétrade de megásporos     | 0              | 0     | 0          | 0     | 0      | 0     |
| S. embrionário 2-nucleado | 71             | 9,61  | 0          | 0     | 0      | 0     |
| S. embrionário 4-nucleado | 105            | 14,21 | 0          | 0     | 0      | 0     |
| Oosfera/núcleos polares   | 170            | 23,01 | 24         | 6,14  | 0      | 0     |
| Oosfera/núcleo central    | 278            | 37,62 | 222        | 56,78 | 13     | 2,07  |
| Embrião/núcleo central    | 7              | 0,95  | 80         | 20,46 | 20     | 3,19  |
| Embrião/endosperma        | 0              | 0     | 19         | 4,86  | 534    | 85,17 |



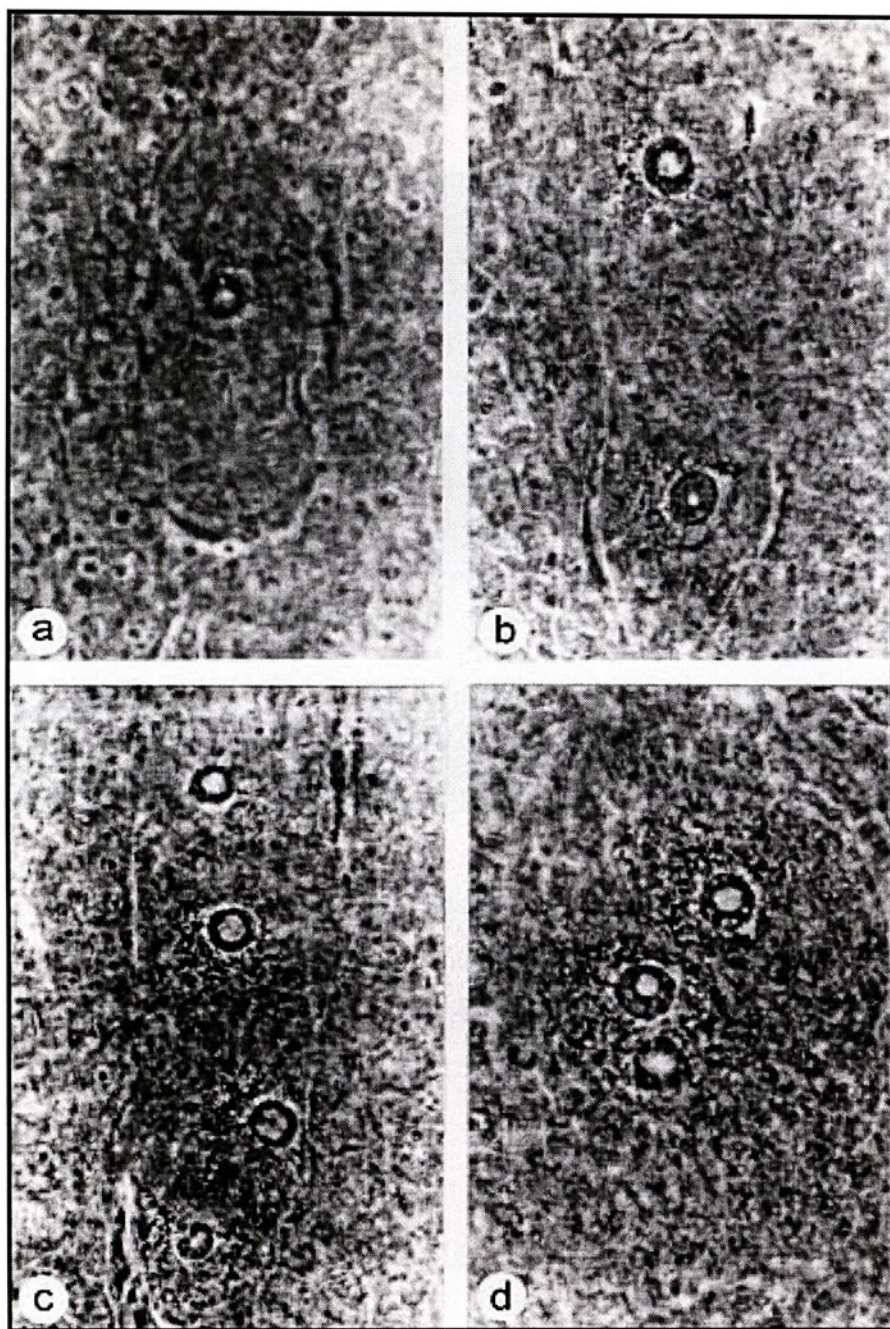


Figura 8. Formação do saco embrionário em *Eupatorium purpurascens*. a, Megasporócito; b, Saco embrionário binucleado; c, Saco embrionário tetranucleado; d, Saco embrionário com oosfera e dois núcleos polares. a,b,d, 937x; c, 812x



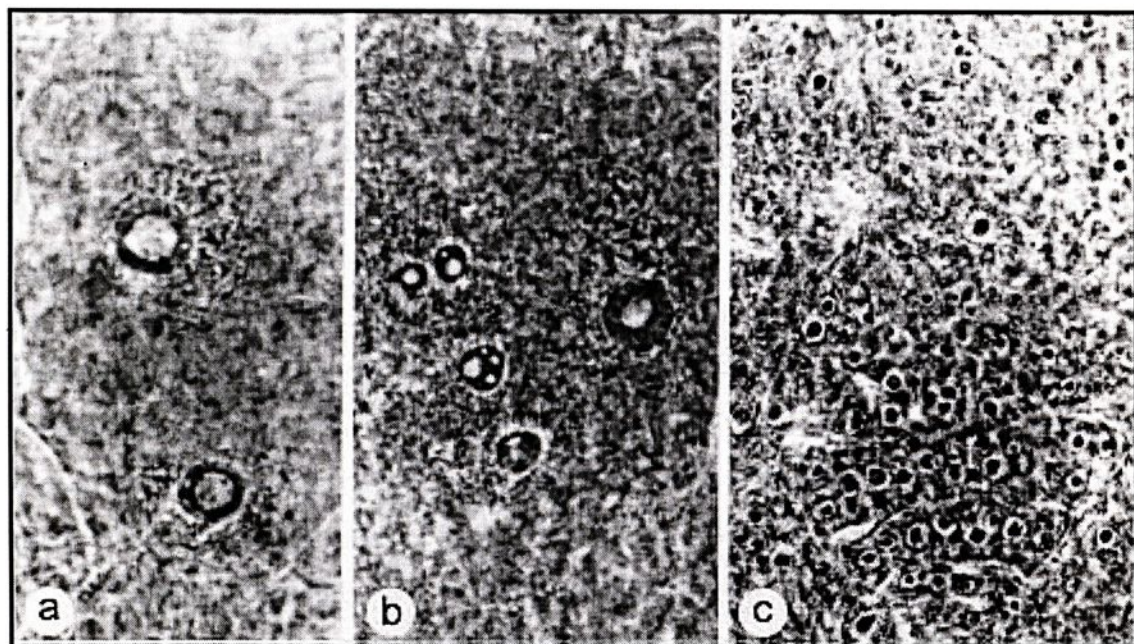


Figura 9. Formação do saco embrionário e do embrião em *Eupatorium purpurascens*. a, Saco embrionário com oosfera e núcleo central; b, Saco embrionário com embrião e núcleo central; c, Embrião (fase globular) e endosperma. a,b, 937x; c, 380x

## 2.2 Microsporogênese e viabilidade do pólen

A análise da microsporogênese em *Eupatorium purpurascens* revelou a ocorrência regular de univalentes, bivalentes, trivalentes e polivalentes superiores, durante a diacinese e metáfase (Figuras 10a, b, c, d), resultando em anáfases I com cromossomos retardatários (Figura 10e). Estes cromossomos retardatários, possivelmente, são englobados em um ou nos dois núcleos, resultando em anáfases cujos conjuntos cromossômicos apresentam deficiência ou duplicação cromossômica (Figura 10f). Os cromossomos retardatários podem ainda não ser englobados nos núcleos sendo, conseqüentemente, eliminados (Figura 11b, seta). Uma contagem de 181 células em anáfase I revelou que 138 (76,2%) não apresentaram cromossomos retardatários, resultando em microsporócitos em final de segunda divisão com 4 núcleos (Figura 11a). A formação de tétrades de micrósporos foi aparentemente normal em 90,94% dos microsporócitos analisados (Figura 11b acima, Tabela 16), o que não exclui a probabilidade destes microsporócitos apresentarem núcleos geneticamente não balanceados. Pode-se observar ainda a produção de micrósporos supernumerários (Tabela 16), bem como a presença de tétrades com micrósporos de tamanhos diferentes (Figura 11b, abaixo), o que evidencia não balanceamento cromossômico.

Os dados de viabilidade de grãos de pólen foram obtidos pela contagem de 3000 grãos a partir de 6 plantas e revelaram que 83,7% apresentam-se corados e, portanto, viáveis (Figura 11c; Tabela 17).



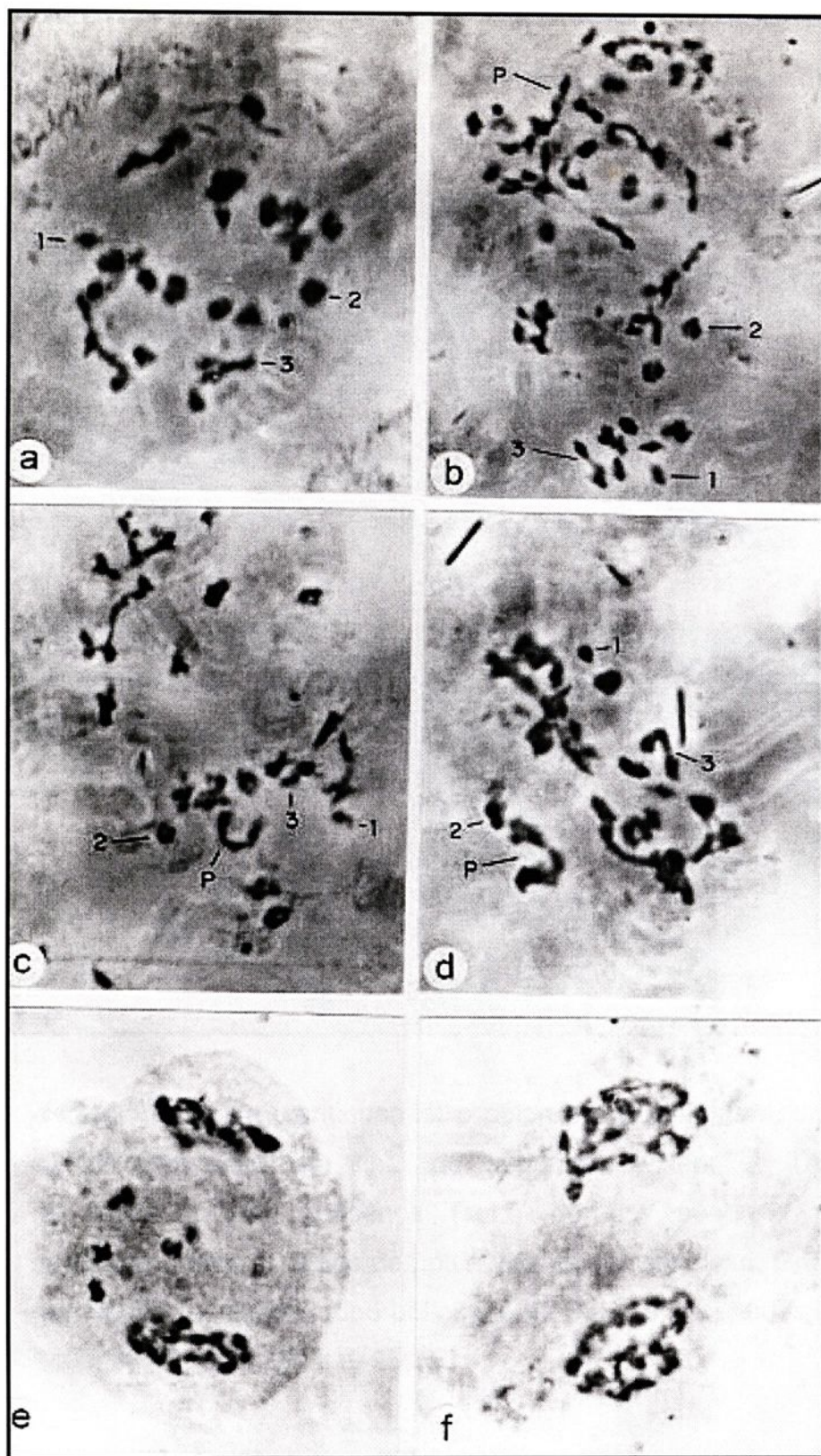


Figura 10. Microsporogênese em *Eupatorium purpurascens*. a,b,c,d, Células em metáfase mostrando univalentes (1), bivalentes (2), trivalentes (3) e polivalentes superiores (P); e, Anáfase I com cromossomos retardatários; f, Anáfase I com número desigual de cromossomos em cada um dos pólos. a,d, 1550x; b, 1250x; c, 1200x; e,f, 1450x



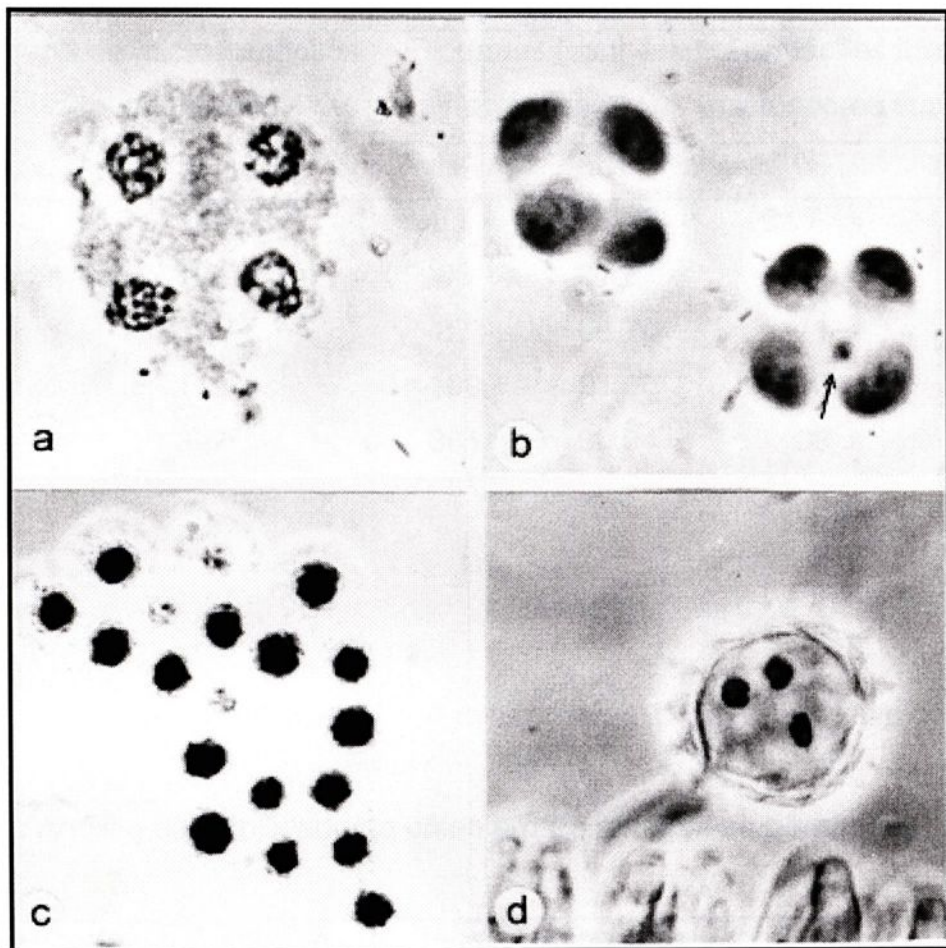


Figura 11. Microsporogênese (continuação) e pólen em *Eupatorium purpurascens*.

a, Microsporócito em final de segunda divisão; b, Tétrades de micrósporos, com presença (seta) de um pequeno micrósporo supernumerário; c, Grãos de pólen viáveis e inviáveis; d, Grão de pólen germinado mostrando tubo polínico e os 3 núcleos contidos no grão. a, 940x; b, 770 x; c, 360x; d, 950x

Tabela 16. Contagem de tétrades e de formações irregulares ao final da microsporogênese em *Eupatorium purpurascens*.

| Planta | Nº de microsporócitos analisados | Tétrades (com 4 micrósporos) |       | Formações irregulares (com micrósporos supernumerários) |       |
|--------|----------------------------------|------------------------------|-------|---------------------------------------------------------|-------|
|        |                                  | Nº                           | %     | Nº                                                      | %     |
| 1      | 84                               | 77                           | 91,67 | 7                                                       | 8,33  |
| 2      | 96                               | 88                           | 91,67 | 8                                                       | 8,33  |
| 3      | 98                               | 87                           | 88,78 | 11                                                      | 11,22 |
| 4      | 119                              | 109                          | 91,60 | 10                                                      | 8,40  |
| Total  | 397                              | 361                          | 90,94 | 36                                                      | 9,06  |

Tabela 17. Análise da viabilidade do pólen em *Eupatorium purpurascens*.

| Planta | Nº de grãos analisados | Grãos corados |      |
|--------|------------------------|---------------|------|
|        |                        | Nº            | %    |
| 1      | 500                    | 429           | 85,8 |
| 2      | 500                    | 432           | 86,4 |
| 3      | 500                    | 428           | 85,6 |
| 4      | 500                    | 409           | 81,8 |
| 5      | 500                    | 424           | 84,8 |
| 6      | 500                    | 389           | 77,8 |
| Total  | 3000                   | 2511          | 83,7 |



2.3 Ocorrência de polinização

Estudos complementares de contagem do número de grãos de pólen sobre a superfície estigmática em *Eupatorium purpurascens* apontam que quase todos os pistilos apresentaram grãos. Foram estudadas 5 plantas num total de 147 pistilos, sendo que 99,3% apresentaram grãos de pólen, numa média de 34,16 grãos por pistilo, como indicado na Tabela 18. Outra análise revelou que 497 grãos de pólen germinados, com o tubo polínico claramente visível, permaneciam na condição trinucleada (Figura 11d).

Tabela 18. Ocorrência de grãos de pólen em estigmas de *Eupatorium purpurascens*

| Planta | Nº de pistilos<br>examinados | Pistilos com grãos |       | Grãos por pistilo |       |
|--------|------------------------------|--------------------|-------|-------------------|-------|
|        |                              | Nº                 | %     | variação          | média |
| 1      | 33                           | 32                 | 96,9  | 7-70              | 33,0  |
| 2      | 36                           | 36                 | 100,0 | 18-94             | 48,0  |
| 3      | 33                           | 33                 | 100,0 | 2-87              | 20,8  |
| 4      | 31                           | 31                 | 100,0 | 8-73              | 41,6  |
| 5      | 14                           | 14                 | 100,0 | 4-42              | 16,0  |
| Total  | 147                          | 146                | 99,3  | 2-94              | 34,16 |

## 2.4 Cariótipo

A análise do cariótipo foi realizada em quatro metáfases, cada uma representando uma plântula. A Figura 12a apresenta uma destas metáfases. As medidas cromossômicas de cada uma das quatro metáfases incluindo braços longo e curto, comprimento total dos braços, proporção dos braços e comprimento relativo do cromossomos em relação ao comprimento total do complemento cromossômico estão apresentadas nas Tabelas 19 a 22. Com base nestas medidas foi possível reunir os 60 cromossomos do complemento em 10 grupos, cada grupo contendo 6 cromossomos, indicando ser o complemento cromossômico constituído de um único genoma representado seis vezes. A Figura 12b apresenta o complemento cromossômico de uma das quatro metáfases analisadas com os cromossomos presumivelmente homólogos agrupados. O ideograma está representado na Figura 12c.

A Tabela 23 caracteriza o genoma da espécie e foi baseada nas médias dos valores obtidos da análise das quatro metáfases. Assim, os valores de cada cromossomo, nesta tabela, representam 24 cromossomos considerados equivalentes, 6 de cada uma das quatro metáfases. O braço longo variou de 0,81  $\mu\text{m}$  (cromossomo 10) a 1,16  $\mu\text{m}$  (cromossomo 1); o braço curto de 0,58  $\mu\text{m}$  (cromossomos 10) a 1,02  $\mu\text{m}$  (cromossomo 1) e o comprimento total cromossômico de 1,39  $\mu\text{m}$  (cromossomo 10) a 2,18  $\mu\text{m}$  (cromossomo 1). Quanto à proporção entre os braços, os valores extremos foram 1,14 (cromossomo 1) e 1,41 (cromossomo 9) e para o comprimento relativo, 7,93 (cromossomo 10) e 12,44 (cromossomo 1). O comprimento total do genoma foi de 17,52  $\mu\text{m}$ .

Nas Tabelas 19 a 22 a ordenação dos cromossomos foi baseada no comprimento cromossômico. No entanto, a proporção cromossômica foi essencial para a caracterização do genoma.

Na análise do cariótipo constatou-se que todos os cromossomos desta espécie são medianos, não sendo possível observar a presença de satélites.





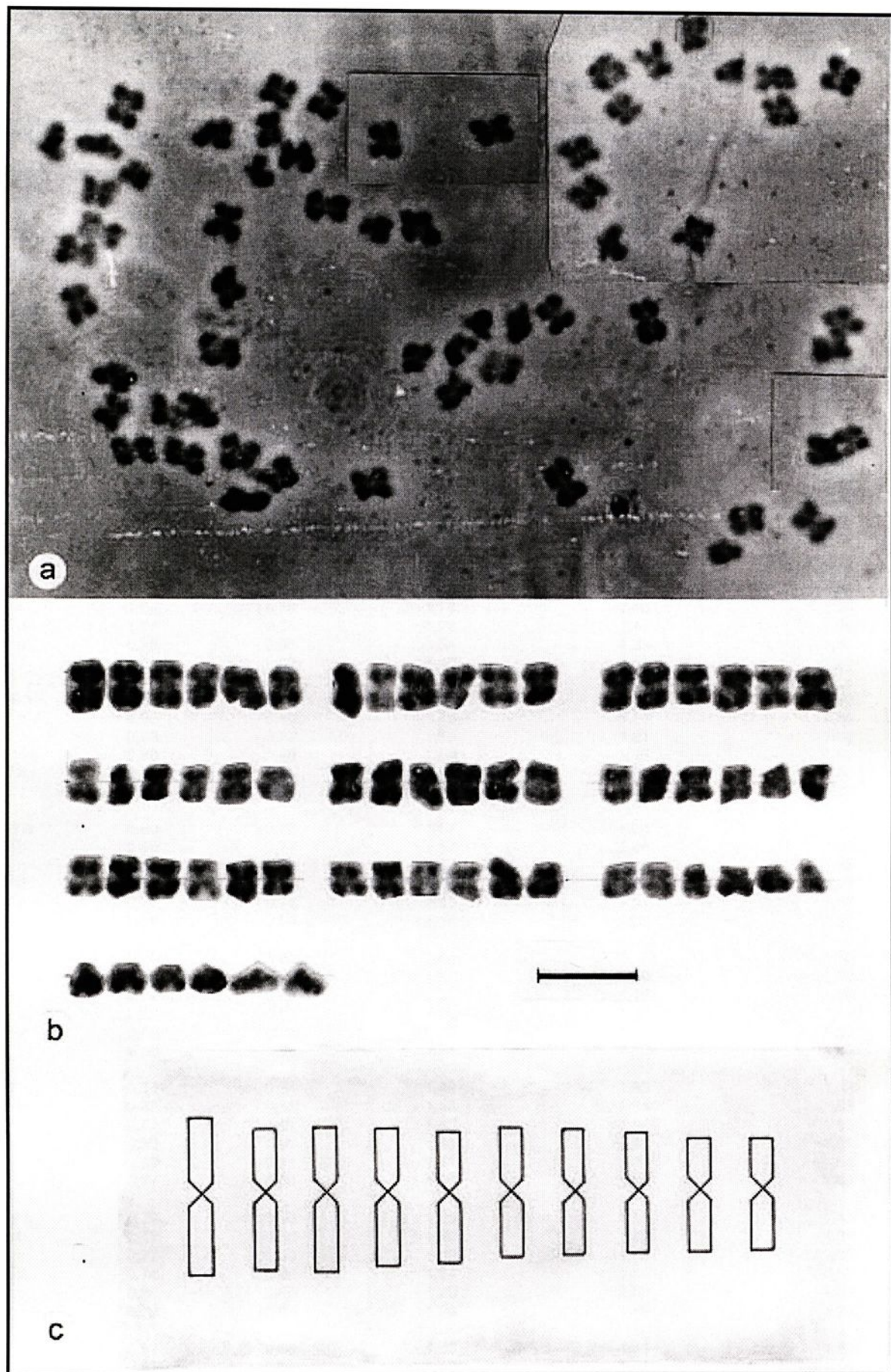


Figura 12. Cromossomos mitóticos de *Eupatorium purpurascens*. a, Célula mitótica em metáfase mostrando 60 cromossomos; b, Cariótipo; c, Ideograma. Escala representa 5  $\mu\text{m}$ .

Tabela 19. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b,c,d,e,f) dos 10 grupos cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 1 de *Eupatorium purpurascens* (Comprimento total do complemento: 93,47  $\mu\text{m}$ ).

| Grupo | Braço cromossômico |      | Comprimento total | Proporção de braços | Comprimento relativo |
|-------|--------------------|------|-------------------|---------------------|----------------------|
|       | (L)                | (C)  | (L+C)             | (L/C)               | %                    |
| 1 a   | 1,12               | 0,85 | 1,97              | 1,31                | 2,11                 |
| b     | 1,12               | 0,82 | 1,94              | 1,36                | 2,08                 |
| c     | 1,12               | 0,82 | 1,94              | 1,36                | 2,08                 |
| d     | 1,06               | 0,85 | 1,91              | 1,24                | 2,04                 |
| e     | 1,06               | 0,85 | 1,91              | 1,24                | 2,04                 |
| f     | 1,06               | 0,80 | 1,86              | 1,32                | 1,99                 |
| 2 a   | 1,14               | 1,06 | 2,20              | 1,07                | 2,35                 |
| b     | 1,12               | 1,06 | 2,18              | 1,05                | 2,33                 |
| c     | 0,88               | 0,88 | 1,76              | 1,00                | 1,88                 |
| d     | 0,85               | 0,85 | 1,70              | 1,00                | 1,82                 |
| e     | 0,82               | 0,82 | 1,64              | 1,00                | 1,75                 |
| f     | 0,85               | 0,77 | 1,62              | 1,10                | 1,73                 |
| 3 a   | 1,06               | 0,93 | 1,99              | 1,14                | 2,13                 |
| b     | 1,01               | 0,85 | 1,86              | 1,18                | 1,99                 |
| c     | 1,01               | 0,77 | 1,78              | 1,31                | 1,90                 |
| d     | 0,96               | 0,82 | 1,78              | 1,17                | 1,90                 |
| e     | 0,90               | 0,77 | 1,67              | 1,17                | 1,79                 |
| f     | 0,88               | 0,64 | 1,52              | 1,37                | 1,63                 |
| 4 a   | 1,04               | 0,80 | 1,84              | 1,30                | 1,97                 |
| b     | 1,01               | 0,77 | 1,78              | 1,31                | 1,90                 |
| c     | 1,04               | 0,74 | 1,78              | 1,40                | 1,90                 |
| d     | 1,04               | 0,74 | 1,78              | 1,40                | 1,90                 |
| e     | 0,88               | 0,66 | 1,54              | 1,33                | 1,65                 |
| f     | 0,82               | 0,58 | 1,40              | 1,41                | 1,50                 |
| 5 a   | 0,98               | 0,82 | 1,80              | 1,19                | 1,93                 |
| b     | 0,93               | 0,80 | 1,73              | 1,16                | 1,85                 |
| c     | 0,93               | 0,77 | 1,70              | 1,21                | 1,82                 |
| d     | 0,80               | 0,69 | 1,49              | 1,16                | 1,60                 |
| e     | 0,80               | 0,66 | 1,46              | 1,21                | 1,56                 |
| f     | 0,66               | 0,56 | 1,22              | 1,18                | 1,31                 |
| 6 a   | 0,80               | 0,77 | 1,57              | 1,04                | 1,68                 |
| b     | 0,80               | 0,77 | 1,57              | 1,04                | 1,68                 |
| c     | 0,80               | 0,74 | 1,54              | 1,08                | 1,65                 |
| d     | 0,80               | 0,74 | 1,54              | 1,08                | 1,65                 |
| e     | 0,77               | 0,74 | 1,51              | 1,04                | 1,62                 |
| f     | 0,58               | 0,56 | 1,14              | 1,03                | 1,22                 |
| 7 a   | 0,88               | 0,80 | 1,68              | 1,10                | 1,80                 |
| b     | 0,85               | 0,77 | 1,62              | 1,10                | 1,73                 |
| c     | 0,74               | 0,66 | 1,40              | 1,12                | 1,50                 |
| d     | 0,69               | 0,61 | 1,30              | 1,13                | 1,39                 |
| e     | 0,69               | 0,61 | 1,30              | 1,13                | 1,39                 |
| f     | 0,66               | 0,58 | 1,24              | 1,14                | 1,33                 |
| 8 a   | 0,85               | 0,64 | 1,49              | 1,33                | 1,59                 |
| b     | 0,82               | 0,61 | 1,43              | 1,34                | 1,53                 |
| c     | 0,82               | 0,61 | 1,43              | 1,34                | 1,53                 |
| d     | 0,80               | 0,61 | 1,41              | 1,31                | 1,51                 |
| e     | 0,80               | 0,61 | 1,41              | 1,31                | 1,51                 |
| f     | 0,77               | 0,58 | 1,35              | 1,33                | 1,44                 |
| 9 a   | 0,77               | 0,53 | 1,30              | 1,51                | 1,42                 |
| b     | 0,77               | 0,53 | 1,30              | 1,45                | 1,39                 |
| c     | 0,77               | 0,53 | 1,30              | 1,45                | 1,39                 |
| d     | 0,74               | 0,50 | 1,24              | 1,48                | 1,33                 |
| e     | 0,72               | 0,48 | 1,20              | 1,50                | 1,28                 |
| f     | 0,72               | 0,48 | 1,20              | 1,50                | 1,28                 |
| 10 a  | 0,82               | 0,58 | 1,40              | 1,41                | 1,50                 |
| b     | 0,82               | 0,58 | 1,40              | 1,41                | 1,50                 |
| c     | 0,82               | 0,56 | 1,38              | 1,46                | 1,48                 |
| d     | 0,61               | 0,45 | 1,06              | 1,35                | 1,13                 |
| e     | 0,58               | 0,42 | 1,00              | 1,38                | 1,07                 |
| f     | 0,58               | 0,40 | 0,98              | 1,45                | 1,05                 |



Tabela 20. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b,c,d,e,f) dos 10 grupos cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 2 de *Eupatorium purpurascens* (Comprimento total do complemento: 98,74  $\mu\text{m}$ ).

| Grupo | Braço cromossômico |      | Comprimento total | Proporção de braços | Comprimento relativo |
|-------|--------------------|------|-------------------|---------------------|----------------------|
|       | (L)                | (C)  |                   | (L/C)               | %                    |
| 1 a   | 1,20               | 0,98 | 2,18              | 1,22                | 2,21                 |
| b     | 1,17               | 0,96 | 2,13              | 1,22                | 2,16                 |
| c     | 1,14               | 0,93 | 2,07              | 1,22                | 2,10                 |
| d     | 1,12               | 0,93 | 2,05              | 1,20                | 2,08                 |
| e     | 1,14               | 0,90 | 2,04              | 1,26                | 2,07                 |
| f     | 1,06               | 0,85 | 1,91              | 1,24                | 1,93                 |
| 2 a   | 1,33               | 0,85 | 2,18              | 1,56                | 2,21                 |
| b     | 1,33               | 0,80 | 2,13              | 1,66                | 2,16                 |
| c     | 1,17               | 0,77 | 1,94              | 1,52                | 1,96                 |
| d     | 1,14               | 0,74 | 1,88              | 1,54                | 1,91                 |
| e     | 0,88               | 0,59 | 1,47              | 1,49                | 1,49                 |
| f     | 0,72               | 0,48 | 1,20              | 1,50                | 1,22                 |
| 3 a   | 0,96               | 0,85 | 1,81              | 1,13                | 1,83                 |
| b     | 0,98               | 0,80 | 1,78              | 1,22                | 1,80                 |
| c     | 0,93               | 0,82 | 1,75              | 1,13                | 1,77                 |
| d     | 0,93               | 0,80 | 1,73              | 1,16                | 1,75                 |
| e     | 0,93               | 0,80 | 1,73              | 1,16                | 1,75                 |
| f     | 0,93               | 0,80 | 1,73              | 1,16                | 1,75                 |
| 4 a   | 0,93               | 0,93 | 1,86              | 1,00                | 1,88                 |
| b     | 0,88               | 0,85 | 1,73              | 1,03                | 1,75                 |
| c     | 0,85               | 0,82 | 1,67              | 1,03                | 1,69                 |
| d     | 0,82               | 0,82 | 1,64              | 1,00                | 1,66                 |
| e     | 0,82               | 0,80 | 1,62              | 1,02                | 1,644                |
| f     | 0,80               | 0,80 | 1,60              | 1,00                | 1,62                 |
| 5 a   | 1,06               | 0,74 | 1,80              | 1,43                | 1,82                 |
| b     | 1,01               | 0,72 | 1,73              | 1,40                | 1,75                 |
| c     | 0,96               | 0,66 | 1,62              | 1,45                | 1,64                 |
| d     | 0,96               | 0,66 | 1,62              | 1,45                | 1,64                 |
| e     | 0,93               | 0,66 | 1,59              | 1,41                | 1,61                 |
| f     | 0,93               | 0,66 | 1,59              | 1,41                | 1,61                 |
| 6 a   | 0,98               | 0,93 | 1,91              | 1,05                | 1,93                 |
| b     | 0,96               | 0,88 | 1,84              | 1,09                | 1,86                 |
| c     | 0,85               | 0,80 | 1,65              | 1,06                | 1,67                 |
| d     | 0,77               | 0,72 | 1,49              | 1,07                | 1,51                 |
| e     | 0,77               | 0,72 | 1,49              | 1,07                | 1,51                 |
| f     | 0,74               | 0,69 | 1,43              | 1,07                | 1,45                 |
| 7 a   | 0,88               | 0,74 | 1,62              | 1,19                | 1,64                 |
| b     | 0,85               | 0,74 | 1,59              | 1,15                | 1,61                 |
| c     | 0,85               | 0,74 | 1,59              | 1,15                | 1,61                 |
| d     | 0,85               | 0,74 | 1,59              | 1,15                | 1,61                 |
| e     | 0,80               | 0,72 | 1,52              | 1,11                | 1,54                 |
| f     | 0,80               | 0,69 | 1,49              | 1,16                | 1,51                 |
| 8 a   | 1,06               | 0,69 | 1,75              | 1,53                | 1,77                 |
| b     | 1,06               | 0,66 | 1,72              | 1,60                | 1,74                 |
| c     | 0,96               | 0,58 | 1,54              | 1,65                | 1,56                 |
| d     | 0,93               | 0,58 | 1,51              | 1,60                | 1,53                 |
| e     | 0,85               | 0,56 | 1,41              | 1,52                | 1,43                 |
| f     | 0,88               | 0,53 | 1,41              | 1,66                | 1,43                 |
| 9 a   | 0,85               | 0,64 | 1,49              | 1,33                | 1,51                 |
| b     | 0,80               | 0,66 | 1,46              | 1,21                | 1,48                 |
| c     | 0,80               | 0,66 | 1,46              | 1,21                | 1,48                 |
| d     | 0,85               | 0,61 | 1,46              | 1,39                | 1,48                 |
| e     | 0,80               | 0,61 | 1,41              | 1,31                | 1,43                 |
| f     | 0,77               | 0,64 | 1,41              | 1,20                | 1,43                 |
| 10 a  | 0,80               | 0,58 | 1,38              | 1,38                | 1,40                 |
| b     | 0,77               | 0,56 | 1,33              | 1,37                | 1,35                 |
| c     | 0,77               | 0,53 | 1,30              | 1,45                | 1,32                 |
| d     | 0,74               | 0,53 | 1,27              | 1,39                | 1,29                 |
| e     | 0,69               | 0,56 | 1,25              | 1,23                | 1,27                 |
| f     | 0,66               | 0,53 | 1,19              | 1,24                | 1,20                 |

Tabela 21. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b,c,d,e,f) dos 10 grupos cromossômicos considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 3 de *Eupatorium purpurascens* (Comprimento total do complemento: 112,54  $\mu\text{m}$ ).

| Grupo | Braço cromossômico |      | Comprimento total<br>(L+C) | Proporção de braços<br>(L/C) | Comprimento relativo<br>% |
|-------|--------------------|------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|
|       | (L)                | (C)  |                            |                              |                           |
| 1 a   | 1,22               | 1,20 | 2,42                       | 1,01                         | 2,15                      |
| b     | 1,22               | 1,17 | 2,39                       | 1,04                         | 2,12                      |
| c     | 1,22               | 1,17 | 2,39                       | 1,04                         | 2,12                      |
| d     | 1,20               | 1,14 | 2,34                       | 1,05                         | 2,08                      |
| e     | 1,12               | 1,09 | 2,21                       | 1,03                         | 1,96                      |
| f     | 1,12               | 1,06 | 2,18                       | 1,05                         | 1,94                      |
| 2 a   | 1,20               | 1,12 | 2,32                       | 1,07                         | 2,06                      |
| b     | 1,12               | 1,04 | 2,16                       | 1,07                         | 1,92                      |
| c     | 1,12               | 1,04 | 2,16                       | 1,07                         | 1,92                      |
| d     | 1,09               | 1,01 | 2,10                       | 1,08                         | 1,87                      |
| e     | 1,06               | 1,01 | 2,07                       | 1,05                         | 1,84                      |
| f     | 1,06               | 1,01 | 2,07                       | 1,05                         | 1,84                      |
| 3 a   | 1,30               | 0,93 | 2,23                       | 1,40                         | 1,98                      |
| b     | 1,30               | 0,90 | 2,20                       | 1,44                         | 1,96                      |
| c     | 1,30               | 0,90 | 2,20                       | 1,44                         | 1,96                      |
| d     | 1,22               | 0,85 | 2,07                       | 1,43                         | 1,84                      |
| e     | 1,17               | 0,82 | 1,99                       | 1,42                         | 1,77                      |
| f     | 1,14               | 0,80 | 1,94                       | 1,42                         | 1,72                      |
| 4 a   | 1,46               | 0,80 | 2,26                       | 1,82                         | 2,01                      |
| b     | 1,41               | 0,77 | 2,18                       | 1,83                         | 1,94                      |
| c     | 1,38               | 0,74 | 2,12                       | 1,86                         | 1,88                      |
| d     | 1,30               | 0,72 | 2,02                       | 1,80                         | 1,79                      |
| e     | 1,20               | 0,66 | 1,86                       | 1,82                         | 1,65                      |
| f     | 1,20               | 0,66 | 1,86                       | 1,82                         | 1,65                      |
| 5 a   | 1,04               | 0,93 | 1,97                       | 1,12                         | 1,75                      |
| b     | 1,04               | 0,93 | 1,97                       | 1,12                         | 1,75                      |
| c     | 1,04               | 0,93 | 1,97                       | 1,12                         | 1,75                      |
| d     | 1,01               | 0,93 | 1,94                       | 1,08                         | 1,73                      |
| e     | 1,01               | 0,93 | 1,94                       | 1,08                         | 1,73                      |
| f     | 1,01               | 0,93 | 1,94                       | 1,08                         | 1,73                      |
| 6 a   | 0,93               | 0,93 | 1,86                       | 1,00                         | 1,65                      |
| b     | 0,93               | 0,93 | 1,86                       | 1,00                         | 1,65                      |
| c     | 0,93               | 0,93 | 1,86                       | 1,00                         | 1,65                      |
| d     | 0,88               | 0,88 | 1,76                       | 1,00                         | 1,56                      |
| e     | 0,88               | 0,88 | 1,76                       | 1,00                         | 1,56                      |
| f     | 0,88               | 0,88 | 1,76                       | 1,00                         | 1,56                      |
| 7 a   | 1,01               | 0,77 | 1,78                       | 1,31                         | 1,58                      |
| b     | 1,01               | 0,77 | 1,78                       | 1,31                         | 1,58                      |
| c     | 0,98               | 0,74 | 1,72                       | 1,32                         | 1,53                      |
| d     | 0,98               | 0,74 | 1,72                       | 1,32                         | 1,53                      |
| e     | 0,96               | 0,72 | 1,68                       | 1,33                         | 1,49                      |
| f     | 0,96               | 0,72 | 1,68                       | 1,33                         | 1,49                      |
| 8 a   | 0,85               | 0,82 | 1,67                       | 1,03                         | 1,48                      |
| b     | 0,85               | 0,82 | 1,67                       | 1,03                         | 1,48                      |
| c     | 0,85               | 0,82 | 1,67                       | 1,03                         | 1,48                      |
| d     | 0,85               | 0,80 | 1,65                       | 1,06                         | 1,47                      |
| e     | 0,85               | 0,80 | 1,65                       | 1,06                         | 1,47                      |
| f     | 0,85               | 0,80 | 1,65                       | 1,06                         | 1,47                      |
| 9 a   | 0,85               | 0,66 | 1,51                       | 1,29                         | 1,34                      |
| b     | 0,85               | 0,66 | 1,51                       | 1,29                         | 1,34                      |
| c     | 0,85               | 0,66 | 1,51                       | 1,29                         | 1,34                      |
| d     | 0,85               | 0,66 | 1,51                       | 1,29                         | 1,34                      |
| e     | 0,82               | 0,66 | 1,48                       | 1,24                         | 1,32                      |
| f     | 0,82               | 0,66 | 1,48                       | 1,24                         | 1,32                      |
| 10 a  | 1,01               | 0,58 | 1,59                       | 1,74                         | 1,41                      |
| b     | 0,93               | 0,53 | 1,46                       | 1,75                         | 1,30                      |
| c     | 0,93               | 0,53 | 1,46                       | 1,75                         | 1,30                      |
| d     | 0,93               | 0,53 | 1,46                       | 1,75                         | 1,30                      |
| e     | 0,93               | 0,53 | 1,46                       | 1,75                         | 1,30                      |
| f     | 0,93               | 0,53 | 1,46                       | 1,75                         | 1,30                      |



Tabela 22. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b,c,d,e,f) dos 10 grupos cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 4 de *Eupatorium purpurascens* (Comprimento total do complemento: 117,07  $\mu\text{m}$ ).

| Grupo | Braço cromossômico |      | Comprimento total<br>(L+C) | Proporção de braços<br>(L/C) | Comprimento relativo<br>% |
|-------|--------------------|------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|
|       | (L)                | (C)  |                            |                              |                           |
| 1 a   | 1,28               | 1,22 | 2,50                       | 1,05                         | 2,14                      |
| b     | 1,28               | 1,22 | 2,50                       | 1,05                         | 2,14                      |
| c     | 1,28               | 1,20 | 2,48                       | 1,06                         | 2,12                      |
| d     | 1,22               | 1,20 | 2,42                       | 1,01                         | 2,07                      |
| e     | 1,22               | 1,17 | 2,39                       | 1,04                         | 2,04                      |
| f     | 1,22               | 1,17 | 2,39                       | 1,04                         | 2,04                      |
| 2 a   | 1,28               | 1,01 | 2,29                       | 1,26                         | 1,96                      |
| b     | 1,28               | 1,01 | 2,29                       | 1,26                         | 1,96                      |
| c     | 1,20               | 0,93 | 2,13                       | 1,29                         | 1,82                      |
| d     | 1,12               | 0,88 | 2,00                       | 1,27                         | 1,71                      |
| e     | 1,12               | 0,88 | 2,00                       | 1,27                         | 1,71                      |
| f     | 1,12               | 0,88 | 2,00                       | 1,27                         | 1,71                      |
| 3 a   | 1,33               | 0,88 | 2,21                       | 1,51                         | 1,89                      |
| b     | 1,33               | 0,88 | 2,21                       | 1,51                         | 1,89                      |
| c     | 1,28               | 0,85 | 2,13                       | 1,50                         | 1,82                      |
| d     | 1,25               | 0,82 | 2,07                       | 1,52                         | 1,77                      |
| e     | 1,20               | 0,80 | 2,00                       | 1,50                         | 1,71                      |
| f     | 1,20               | 0,80 | 2,00                       | 1,50                         | 1,71                      |
| 4 a   | 1,12               | 1,01 | 2,13                       | 1,11                         | 1,82                      |
| b     | 1,12               | 1,01 | 2,13                       | 1,11                         | 1,82                      |
| c     | 1,09               | 0,98 | 2,07                       | 1,11                         | 1,77                      |
| d     | 1,09               | 0,98 | 2,07                       | 1,11                         | 1,77                      |
| e     | 1,06               | 0,96 | 2,02                       | 1,10                         | 1,72                      |
| f     | 1,06               | 0,96 | 2,02                       | 1,10                         | 1,72                      |
| 5 a   | 1,22               | 0,88 | 2,10                       | 1,38                         | 1,79                      |
| b     | 1,20               | 0,85 | 2,05                       | 1,41                         | 1,75                      |
| c     | 1,20               | 0,85 | 2,05                       | 1,41                         | 1,75                      |
| d     | 1,20               | 0,85 | 2,05                       | 1,41                         | 1,75                      |
| e     | 1,17               | 0,82 | 1,99                       | 1,42                         | 1,70                      |
| f     | 1,17               | 0,82 | 1,99                       | 1,42                         | 1,70                      |
| 6 a   | 1,20               | 0,72 | 1,92                       | 1,66                         | 1,64                      |
| b     | 1,20               | 0,72 | 1,92                       | 1,66                         | 1,64                      |
| c     | 1,17               | 0,69 | 1,86                       | 1,69                         | 1,59                      |
| d     | 1,17               | 0,69 | 1,86                       | 1,69                         | 1,59                      |
| e     | 1,12               | 0,66 | 1,78                       | 1,69                         | 1,52                      |
| f     | 1,12               | 0,66 | 1,78                       | 1,69                         | 1,52                      |
| 7 a   | 1,01               | 0,93 | 1,94                       | 1,08                         | 1,66                      |
| b     | 1,01               | 0,93 | 1,94                       | 1,08                         | 1,66                      |
| c     | 0,98               | 0,90 | 1,88                       | 1,09                         | 1,61                      |
| d     | 0,93               | 0,85 | 1,78                       | 1,09                         | 1,52                      |
| e     | 0,90               | 0,82 | 1,72                       | 1,09                         | 1,47                      |
| f     | 0,90               | 0,82 | 1,72                       | 1,09                         | 1,47                      |
| 8 a   | 0,96               | 0,93 | 1,89                       | 1,03                         | 1,61                      |
| b     | 0,90               | 0,88 | 1,78                       | 1,02                         | 1,52                      |
| c     | 0,88               | 0,88 | 1,76                       | 1,00                         | 1,50                      |
| d     | 0,85               | 0,85 | 1,70                       | 1,00                         | 1,45                      |
| e     | 0,85               | 0,85 | 1,70                       | 1,00                         | 1,45                      |
| f     | 0,80               | 0,80 | 1,60                       | 1,00                         | 1,37                      |
| 9 a   | 1,09               | 0,66 | 1,75                       | 1,65                         | 1,49                      |
| b     | 1,09               | 0,66 | 1,75                       | 1,65                         | 1,49                      |
| c     | 1,06               | 0,66 | 1,72                       | 1,60                         | 1,47                      |
| d     | 1,06               | 0,66 | 1,72                       | 1,60                         | 1,47                      |
| e     | 1,04               | 0,64 | 1,68                       | 1,62                         | 1,43                      |
| f     | 1,04               | 0,64 | 1,68                       | 1,62                         | 1,43                      |
| 10 a  | 0,88               | 0,74 | 1,62                       | 1,19                         | 1,38                      |
| b     | 0,88               | 0,74 | 1,62                       | 1,19                         | 1,38                      |
| c     | 0,85               | 0,74 | 1,59                       | 1,15                         | 1,36                      |
| d     | 0,85               | 0,74 | 1,59                       | 1,15                         | 1,36                      |
| e     | 0,85               | 0,72 | 1,57                       | 1,18                         | 1,34                      |
| f     | 0,85               | 0,72 | 1,57                       | 1,18                         | 1,34                      |



Tabela 23. Comprimento ( $\bar{x} \pm Sx$ , em  $\mu m$ ) dos braços longo (L) e curto (C) de 10 cromossomos das 4 células estudadas de *Eupatorium purpurascens*. Comprimento total médio do genoma: 17,52  $\mu m$ .

| Cromossomo | L               | C               | L+C             | L/C  | L+C/17,52 | Tipo |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|-----------|------|
| 1          | 1,16 $\pm$ 0,01 | 1,02 $\pm$ 0,03 | 2,18 $\pm$ 0,04 | 1,14 | 12,44     | m    |
| 2          | 1,08 $\pm$ 0,03 | 0,89 $\pm$ 0,03 | 1,97 $\pm$ 0,05 | 1,21 | 11,25     | m    |
| 3          | 1,10 $\pm$ 0,03 | 0,83 $\pm$ 0,01 | 1,93 $\pm$ 0,04 | 1,32 | 11,02     | m    |
| 4          | 1,06 $\pm$ 0,03 | 0,81 $\pm$ 0,02 | 1,87 $\pm$ 0,04 | 1,31 | 10,67     | m    |
| 5          | 1,01 $\pm$ 0,02 | 0,79 $\pm$ 0,02 | 1,80 $\pm$ 0,04 | 1,28 | 10,27     | m    |
| 6          | 0,92 $\pm$ 0,03 | 0,77 $\pm$ 0,02 | 1,69 $\pm$ 0,04 | 1,19 | 9,65      | m    |
| 7          | 0,88 $\pm$ 0,02 | 0,75 $\pm$ 0,01 | 1,63 $\pm$ 0,03 | 1,17 | 9,30      | m    |
| 8          | 0,87 $\pm$ 0,01 | 0,72 $\pm$ 0,02 | 1,59 $\pm$ 0,03 | 1,21 | 9,08      | m    |
| 9          | 0,86 $\pm$ 0,02 | 0,61 $\pm$ 0,01 | 1,47 $\pm$ 0,03 | 1,41 | 8,39      | m    |
| 10         | 0,81 $\pm$ 0,02 | 0,58 $\pm$ 0,02 | 1,39 $\pm$ 0,03 | 1,39 | 7,93      | m    |



## 2.5 Produção e germinabilidade de sementes

Estudos complementares para verificar a produção de sementes foram realizados em 3 plantas de *Eupatorium purpurascens* num total de 2935 ovários examinados, dos quais 1669 (56,86%) produziram sementes contendo embriões (Tabela 24).

Os resultados dos testes de germinação de sementes retiradas de 3 plantas (50 sementes por planta) revelaram porcentagens variando de 28% (14 sementes) a 60% (30 sementes). Das 150 sementes testadas 66 (44%) germinaram, como indicado na Tabela 25 .

Tabela 24. Produção de sementes em *Eupatorium purpurascens*.

| Planta | Total de ovários<br>examinados | Sementes produzidas |       |
|--------|--------------------------------|---------------------|-------|
|        |                                | Nº                  | %     |
| 1      | 984                            | 550                 | 55,90 |
| 2      | 966                            | 619                 | 64,08 |
| 3      | 985                            | 500                 | 50,76 |
| Total  | 2935                           | 1669                | 56,86 |

Tabela 25. Germinabilidade de sementes em *Eupatorium purpurascens* (50 sementes por planta).

| Planta | Sementes germinadas |    |
|--------|---------------------|----|
|        | Nº                  | %  |
| 1      | 14                  | 28 |
| 2      | 22                  | 44 |
| 3      | 30                  | 60 |
| Total  | 66                  | 44 |

### 3. *Eupatorium laevigatum*

#### 3.1 Embriologia

A análise de óvulos clarificados de *Eupatorium laevigatum* foi realizada a partir de 8 plantas, num total de 2074 óvulos examinados. Destes, 1252 foram provenientes de flores em fases iniciais de desenvolvimento floral, 317 em pré-antese e 505 em antese. As etapas embriológicas encontradas nos óvulos de *E. laevigatum*, nas diferentes fases de desenvolvimento floral, estão apresentadas na Tabela 26. Neste estudo foi observada a presença de megasporócitos (Figura 13a), sacos embrionários binucleados (Figura 13b e c) e tetranucleados (Figura 13d), oosfera/núcleos polares (Figura 14a), oosfera/núcleo central (Figura 14b), embrião/núcleo central (Figura 14c) e embrião/endosperma (Figura 14d), além de sacos embrionários abortados.

Dos 1252 óvulos examinados nas fases iniciais de desenvolvimento floral 13,26% (166) corresponderam a megasporócitos, 13,58% (170) a sacos embrionários binucleados e 8,95% (112) a sacos embrionários tetranucleados, não aparecendo os estágios de díades e tétrades de megásporos. A proporção de oosfera/núcleos polares foi maior nesta fase floral (15,65%) quando comparada às duas seguintes. Oosfera/núcleo central correspondeu a 18,05% (226) dos óvulos analisados. A proporção de embrião/núcleo central e embrião/endosperma (10,46% e 1,76%) foi menor do que nas fases de pré-antese e antese. A proporção de sacos embrionários abortados foi de 18,29%.

Dos 317 óvulos examinados na fase de pré-antese não apareceram os estágios de megasporócito, díades e tétrades de megásporos e sacos embrionários binucleado e tetranucleado. Oosfera/núcleos polares correspondeu a 3,16% (10) e oosfera/núcleo central a 21,45% (68). Pode-se notar um aumento na proporção de embrião/núcleo central e embrião/endosperma (33,12% e 24,29%, respectivamente). A proporção de sacos embrionários abortados foi de 17,98%.

Dos 505 óvulos examinados na fase de antese não ocorreram megasporócitos, díades e tétrades de megásporos e sacos embrionários binucleados e tetranucleados, com uma diminuição na porcentagem de oosferas/núcleos polares (0,99%), oosfera/núcleo central (9,70%) e embrião/núcleo central (25,54%). Neste estágio de desenvolvimento a proporção de



embrião/endosperma foi de 44,16%. A proporção de sacos embrionários abortados foi de 19,61%.

A análise de óvulos clarificados de *Eupatorium laevigatum*, em fases iniciais de desenvolvimento floral, revelou a presença de uma única célula arquesporrial inicial que funciona diretamente como megasporócito (Figura 13a). De 1252 óvulos examinados em fases iniciais de desenvolvimento floral nenhum demonstrou a presença de díades e tétrades de megásporos, o que indica a ausência de meiose redutiva. A formação do saco embrionário se faz a partir do megasporócito não reduzido (Figura 13a) que funciona diretamente como megásporo. O núcleo deste ao se dividir dá origem a um saco embrionário binucleado (Figura 13b), cujos núcleos se afastam tomando posição nas extremidades opostas da célula (Figura 13c). Cada um dos núcleos sofre uma segunda divisão formando o saco embrionário tetranucleado (Figura 13d). Posteriormente, uma terceira divisão dará origem ao saco embrionário maduro com 8 núcleos, composto de duas sinérgides, uma oosfera, dois núcleos polares e três antípodas sendo, portanto, do tipo Polygonum. As sinérgides degeneram resultando em um saco embrionário com a oosfera e dois núcleos polares (Figura 14a). Os núcleos polares em seguida se fundem dando origem ao núcleo central (Figura 14b). A oosfera e o núcleo central se dividem partenogeneticamente iniciando o embrião e o endosperma, respectivamente. Observou-se que a oosfera inicia a formação do embrião antes do núcleo central começar a se dividir para formar o endosperma, resultando na ocorrência de embrião e núcleo central (Figura 14c). A presença de embrião e endosperma (Figura 14d) foi constatada já em óvulos de flores nas fases iniciais de desenvolvimento (botões fechados).

Tabela 26. Conteúdo de óvulos de *Eupatorium laevigatum* em diferentes estágios de desenvolvimento floral.

|                           | Estágio Floral |       |            |       |        |       |
|---------------------------|----------------|-------|------------|-------|--------|-------|
|                           | Fase Inicial   |       | Pré-Antese |       | Antese |       |
| Plantas examinadas        | 8              |       | 8          |       | 8      |       |
| Óvulos analisados         | 1252           |       | 317        |       | 505    |       |
| Conteúdo                  | Nº             | %     | Nº         | %     | Nº     | %     |
| S. embrionário abortado   | 229            | 18,29 | 57         | 17,98 | 99     | 19,61 |
| Megasporócito             | 166            | 13,26 | 0          | 0     | 0      | 0     |
| Díade de megásporos       | 0              | 0     | 0          | 0     | 0      | 0     |
| Tétrade de megásporos     | 0              | 0     | 0          | 0     | 0      | 0     |
| S. embrionário 2-nucleado | 170            | 13,58 | 0          | 0     | 0      | 0     |
| S. embrionário 4-nucleado | 112            | 8,95  | 0          | 0     | 0      | 0     |
| Oosfera/núcleos polares   | 196            | 15,65 | 10         | 3,16  | 5      | 0,99  |
| Oosfera/núcleo central    | 226            | 18,05 | 68         | 21,45 | 49     | 9,70  |
| Embrião/núcleo central    | 131            | 10,46 | 105        | 33,12 | 129    | 25,54 |
| Embrião/endosperma        | 22             | 1,76  | 77         | 24,29 | 223    | 44,16 |



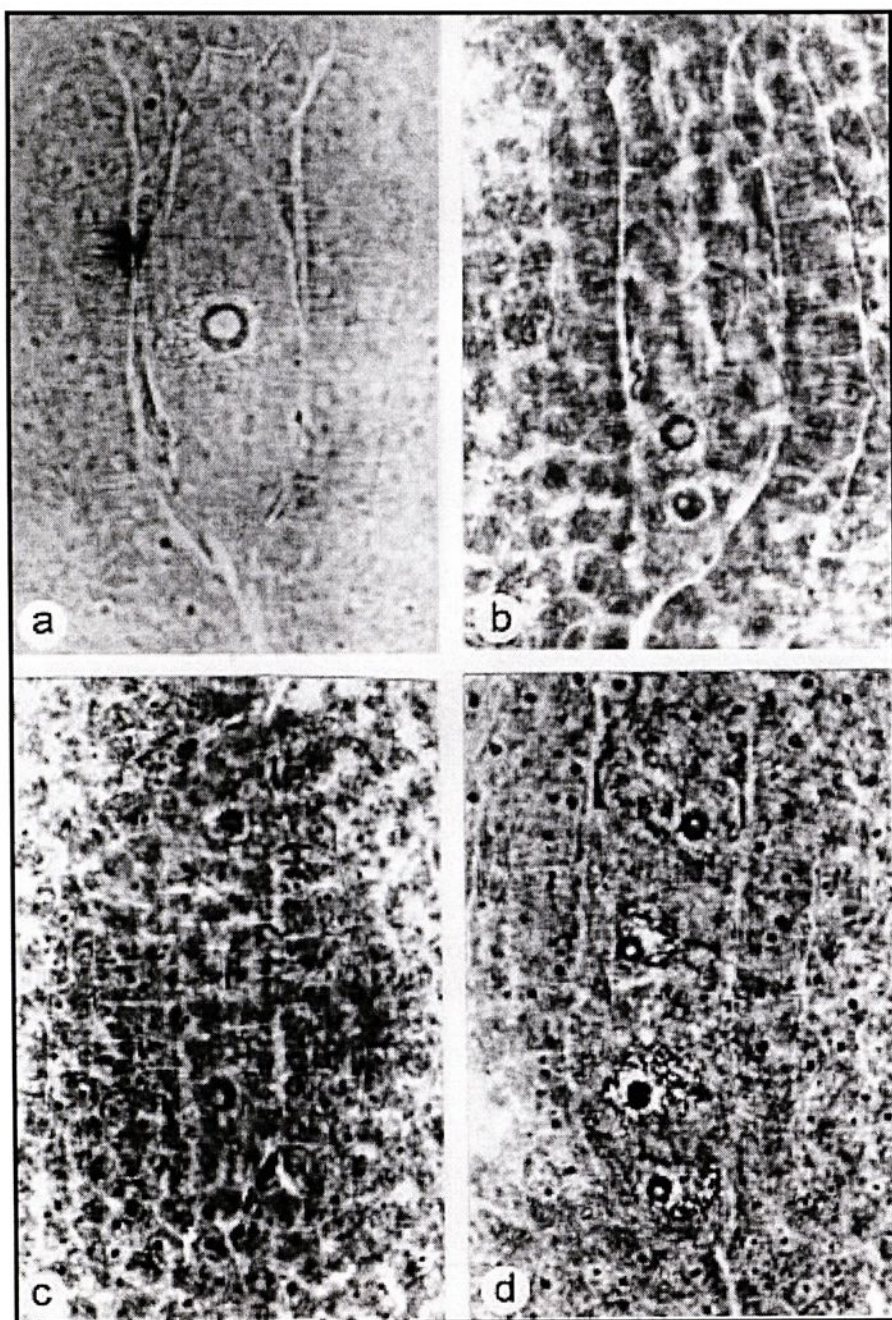


Figura 13. Formação do saco embrionário em *Eupatorium laevigatum*. a, Megasporócito; b, Estágios iniciais de saco embrionário binucleado; c, Estágios tardios de saco embrionário binucleado; d, Saco embrionário tetranucleado. a, 500x; b,d, 620x; c, 940x



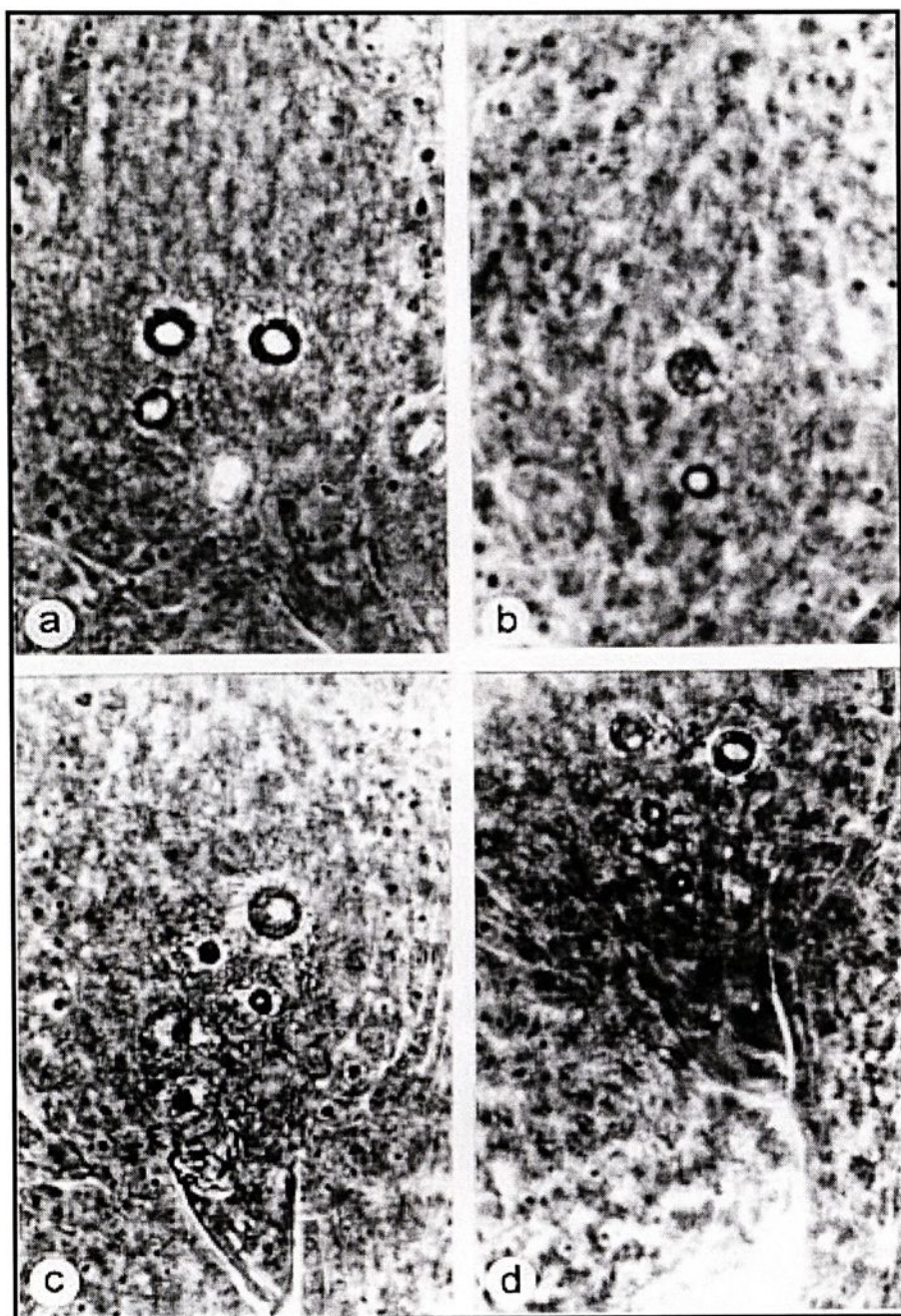


Figura 14. Formação do saco embrionário e do embrião em *Eupatorium laevigatum*.  
 a, Saco embrionário com oosfera e dois núcleos polares; b, Saco embrionário com oosfera e núcleo central; c, Saco embrionário com embrião e núcleo central; d, Saco embrionário com divisões iniciais de embrião e endosperma. a,b,c,d 540x



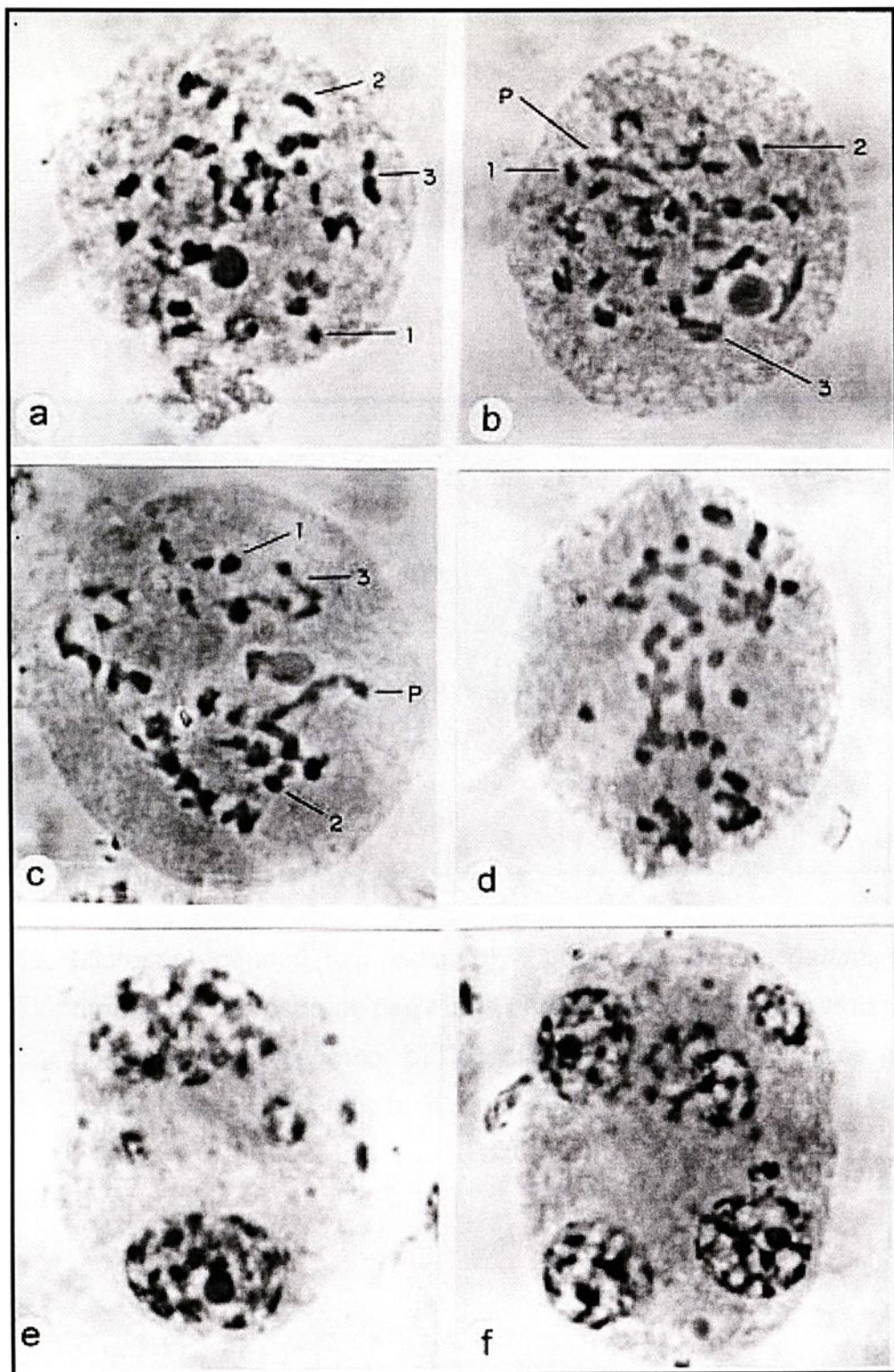


Figura 15. Microsporogênese em *Eupatorium laevigatum*. a, b, c, Células em diacinese mostrando univalentes (1), bivalentes (2), trivalentes (3) e polivalentes superiores (P); d, Anáfase I com cromossomos retardatários; e, f, Células em final de primeira e segunda divisão apresentando micronúcleos. a, 1450x; b,c, 1350x; d,e, 1500x; f, 1600x

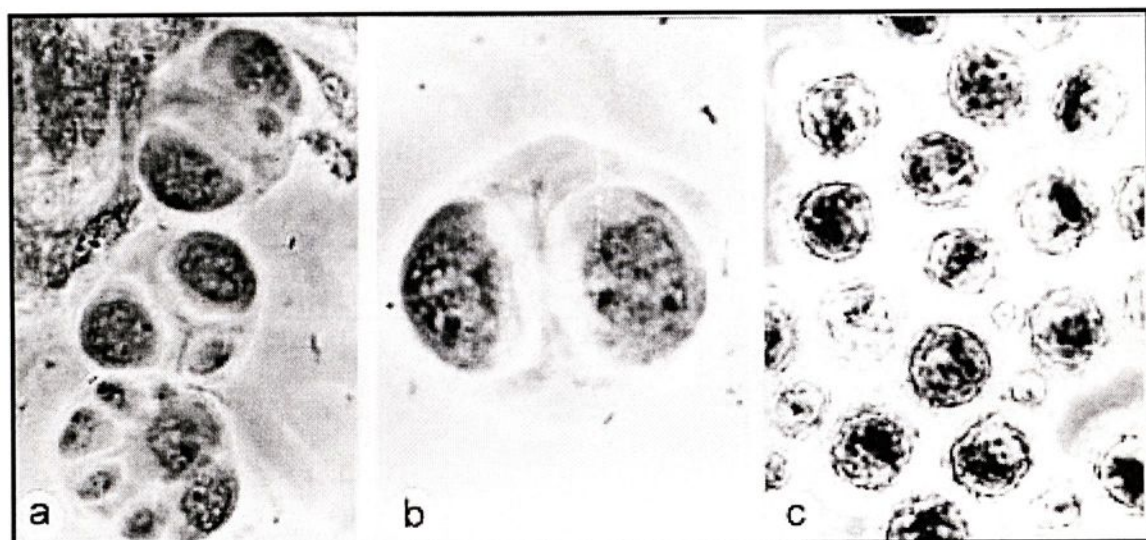


Figura 16. Microsporogênese (continuação) e pólen em *E. laevigatum*. a, Duas díades de micrósporos cada uma com um micrósporo supernumerário e políade de micrósporos; b, Díade de micrósporos; c, Grãos de pólen todos inviáveis. a, 580x; b, 950x; c, 360x



Tabela 27. Contagem de tétrades e de formações irregulares ao final da microsporogênese em *Eupatorium laevigatum*.

| Planta | Nº de microsporócitos analisados | Tétrades (com 4 micrósporos) |      | Formações irregulares (com micrósporos supernumerários) |       |
|--------|----------------------------------|------------------------------|------|---------------------------------------------------------|-------|
|        |                                  | Nº                           | %    | Nº                                                      | %     |
| 1      | 123                              | 6                            | 4,88 | 117                                                     | 95,12 |
| 2      | 110                              | 5                            | 4,55 | 105                                                     | 95,45 |
| 3      | 108                              | 4                            | 3,70 | 104                                                     | 96,30 |
| 4      | 113                              | 5                            | 4,43 | 108                                                     | 95,57 |
| 5      | 105                              | 4                            | 3,81 | 101                                                     | 96,19 |
| 6      | 103                              | 4                            | 3,88 | 99                                                      | 96,12 |
| 7      | 122                              | 6                            | 4,92 | 116                                                     | 95,08 |
| Total  | 784                              | 34                           | 4,34 | 750                                                     | 95,66 |

Tabela 28. Análise da viabilidade do pólen em *Eupatorium laevigatum*.

| Planta | Nº de grãos analisados | Grãos corados |     |
|--------|------------------------|---------------|-----|
|        |                        | Nº            | %   |
| 1      | 500                    | 20            | 4,0 |
| 2      | 500                    | 15            | 3,0 |
| 3      | 500                    | 29            | 5,8 |
| 4      | 500                    | 11            | 2,2 |
| 5      | 500                    | 23            | 4,6 |
| 6      | 500                    | 22            | 4,4 |
| Total  | 3000                   | 120           | 4,0 |

### 3.3 Ocorrência de polinização

A ocorrência de polinização para *Eupatorium laevigatum* foi verificada a partir da contagem de grãos de pólen depositados na superfície estigmática. Foram estudadas 5 plantas num total de 181 pistilos examinados sendo que 58% apresentaram grãos de pólen, numa média de 1,04 grãos por pistilo, como indicado na Tabela 29.

Tabela 29. Ocorrência de grãos de pólen em estigmas de *Eupatorium laevigatum*.

| Planta | Nº de pistilos examinados | Pistilos com grãos |      | Grãos por pistilo |       |
|--------|---------------------------|--------------------|------|-------------------|-------|
|        |                           | Nº                 | %    | variação          | média |
| 1      | 34                        | 23                 | 67,6 | 1 - 4             | 1,2   |
| 2      | 31                        | 18                 | 58,0 | 1 - 4             | 1,0   |
| 3      | 37                        | 29                 | 78,3 | 1 - 6             | 1,8   |
| 4      | 38                        | 15                 | 39,4 | 1 - 3             | 0,5   |
| 5      | 35                        | 20                 | 57,1 | 1 - 3             | 0,7   |
| Total  | 181                       | 105                | 58,0 | 1 - 6             | 1,04  |

### 3.4 Cariótipo

A análise do cariótipo foi realizada em três metáfases cada uma representando uma plântula. A Figura 17a apresenta uma destas metáfases. As medidas cromossômicas de cada uma das três metáfases incluindo braços longo e curto, comprimento total dos braços, proporção dos braços e comprimento relativo do cromossomo em relação ao comprimento total do complemento cromossômico estão apresentadas nas Tabelas 30 a 32. Com base nestas medidas foi possível reunir os 60 cromossomos do complemento em 10 grupos, cada grupo contendo 6 cromossomos, indicando ser o complemento cromossômico constituído de um único genoma representado seis vezes. A Figura 17b apresenta o complemento cromossômico de uma das três metáfases analisadas com os cromossomos presumivelmente homólogos agrupados. O ideograma está representado na Figura 17c.

A Tabela 33 caracteriza o genoma da espécie e foi baseada nas médias dos valores obtidos da análise das três metáfases. Assim, os valores de cada cromossomo, nesta tabela, representam 18 cromossomos considerados equivalentes, 6 de cada uma das três metáfases. O braço longo variou de 0,77  $\mu\text{m}$  (cromossomo 10) a 1,19  $\mu\text{m}$  (cromossomo 1); o braço curto de 0,56  $\mu\text{m}$  (cromossomos 9 e 10) a 0,89  $\mu\text{m}$  (cromossomo 1) e o comprimento total cromossômico de 1,33  $\mu\text{m}$  (cromossomo 10) a 2,08  $\mu\text{m}$  (cromossomo 1). Quanto à proporção entre os braços, os valores extremos foram 1,17 (cromossomo 6) e 1,79 (cromossomo 5) e para o comprimento relativo 7,93 (cromossomo 10) e 12,40 (cromossomo 1). O comprimento total do genoma foi de 16,78  $\mu\text{m}$ .

Nas Tabelas 30 a 32 a ordenação dos cromossomos foi baseada no comprimento cromossômico total. A proporção entre os braços também foi utilizada para a caracterização do genoma.

Através da análise do cariótipo observa-se oito cromossomos medianos (1, 2, 4, 6, 7, 8, 9 e 10) e dois submedianos (3 e 5). Apenas em uma das metáfases analisadas foi possível visualizar a presença de cromossomos SAT (célula 1). Os cromossomos SAT, nesta metáfase, ocorreram no cromossomo número 5.



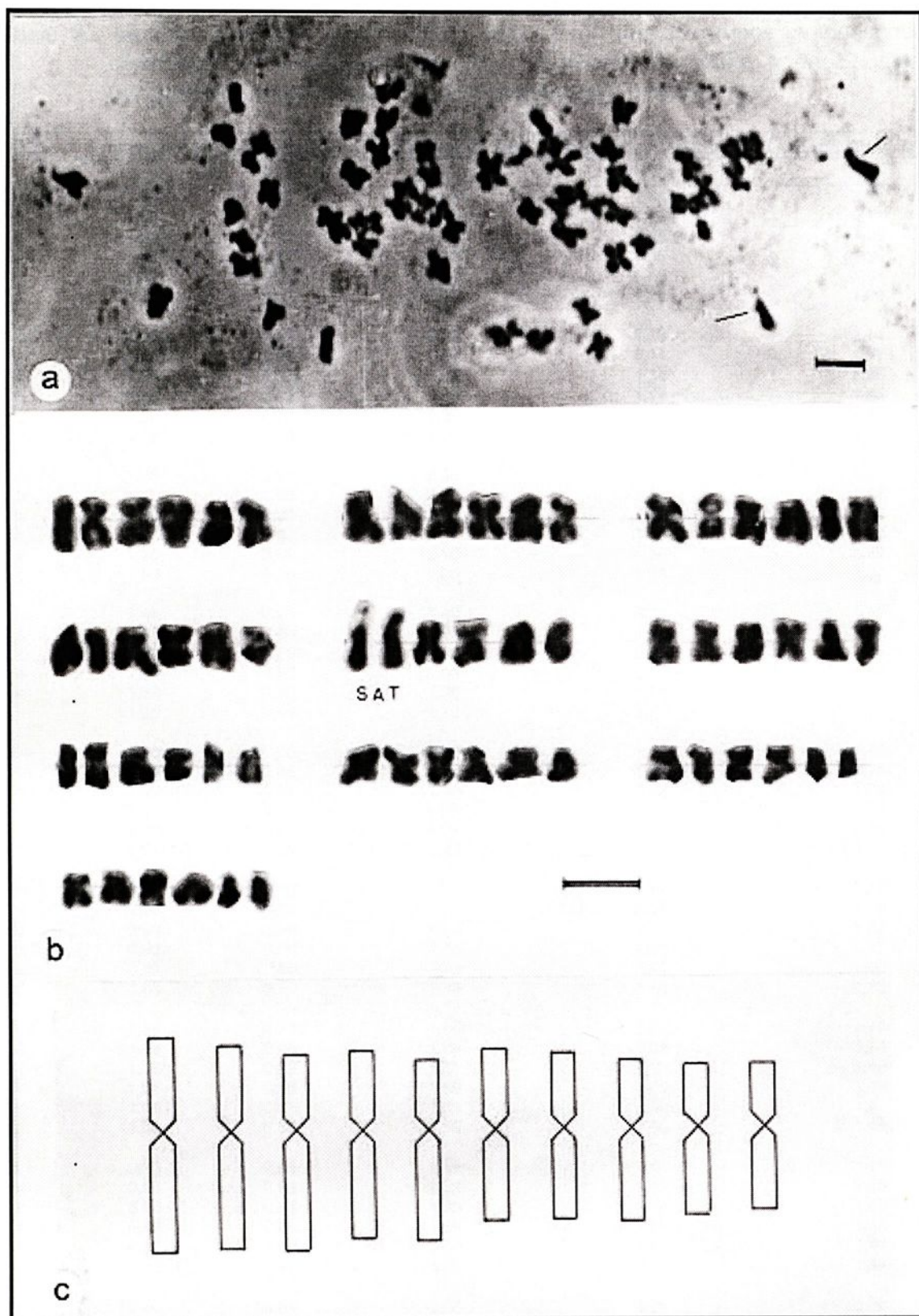


Figura 17. Cromossomos mitóticos de *Eupatorium laevigatum*. a, Célula mitótica em metáfase mostrando 60 cromossomos; b, Cariótipo; c, Ideograma. Escalas representam 5  $\mu\text{m}$ ; linhas indicam satélites.

Tabela 30. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b,c,d,e,f) dos 10 grupos cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 1 de *Eupatorium laevigatum* (Comprimento total do complemento: 106,82  $\mu\text{m}$ ).

| Grupo | Braço cromossômico |      | Comprimento total<br>(L+C) | Proporção de braços<br>(L/C) | Comprimento relativo<br>% |
|-------|--------------------|------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|
|       | (L)                | (C)  |                            |                              |                           |
| 1 a   | 1,46               | 0,80 | 2,26                       | 1,82                         | 2,11                      |
| b     | 1,33               | 0,93 | 2,26                       | 1,43                         | 2,11                      |
| c     | 1,33               | 0,80 | 2,13                       | 1,66                         | 1,99                      |
| d     | 1,33               | 0,80 | 2,13                       | 1,66                         | 1,99                      |
| e     | 1,33               | 0,80 | 2,13                       | 1,66                         | 1,99                      |
| f     | 1,20               | 0,93 | 2,13                       | 1,29                         | 1,99                      |
| 2 a   | 1,20               | 1,06 | 2,26                       | 1,13                         | 2,11                      |
| b     | 1,06               | 0,93 | 1,99                       | 1,14                         | 1,86                      |
| c     | 1,06               | 0,93 | 1,99                       | 1,14                         | 1,86                      |
| d     | 1,06               | 0,93 | 1,99                       | 1,14                         | 1,86                      |
| e     | 1,06               | 0,93 | 1,99                       | 1,14                         | 1,86                      |
| f     | 1,06               | 0,93 | 1,99                       | 1,14                         | 1,86                      |
| 3 a   | 1,20               | 0,80 | 2,00                       | 1,50                         | 1,87                      |
| b     | 1,20               | 0,80 | 2,00                       | 1,50                         | 1,87                      |
| c     | 1,20               | 0,80 | 2,00                       | 1,50                         | 1,87                      |
| d     | 1,20               | 0,80 | 2,00                       | 1,50                         | 1,87                      |
| e     | 1,20               | 0,80 | 2,00                       | 1,50                         | 1,87                      |
| f     | 1,20               | 0,80 | 2,00                       | 1,50                         | 1,87                      |
| 4 a   | 1,46               | 0,53 | 1,99                       | 2,75                         | 1,86                      |
| b     | 1,33               | 0,66 | 1,99                       | 2,01                         | 1,86                      |
| c     | 1,33               | 0,66 | 1,99                       | 2,01                         | 1,86                      |
| d     | 1,33               | 0,66 | 1,99                       | 2,01                         | 1,86                      |
| e     | 1,33               | 0,53 | 1,86                       | 2,51                         | 1,74                      |
| f     | 1,20               | 0,53 | 1,73                       | 2,26                         | 1,62                      |
| 5 a   | 1,20               | 0,66 | 1,86                       | 1,82                         | 1,74                      |
| b     | 1,20               | 0,66 | 1,86                       | 1,82                         | 1,74                      |
| c     | 1,20               | 0,66 | 1,86                       | 1,82                         | 1,74                      |
| d     | 1,20               | 0,66 | 1,86                       | 1,82                         | 1,74                      |
| e     | 1,20               | 0,66 | 1,86                       | 1,82                         | 1,74                      |
| f     | 1,20               | 0,66 | 1,86                       | 1,82                         | 1,74                      |
| 6 a   | 0,93               | 0,80 | 1,73                       | 1,16                         | 1,62                      |
| b     | 0,93               | 0,80 | 1,73                       | 1,16                         | 1,62                      |
| c     | 0,93               | 0,80 | 1,73                       | 1,16                         | 1,62                      |
| d     | 0,93               | 0,80 | 1,73                       | 1,16                         | 1,62                      |
| e     | 0,93               | 0,80 | 1,73                       | 1,16                         | 1,62                      |
| f     | 0,93               | 0,80 | 1,73                       | 1,16                         | 1,62                      |
| 7 a   | 1,06               | 0,80 | 1,86                       | 1,32                         | 1,74                      |
| b     | 1,06               | 0,80 | 1,86                       | 1,32                         | 1,74                      |
| c     | 1,06               | 0,53 | 1,59                       | 2,00                         | 1,48                      |
| d     | 1,06               | 0,53 | 1,59                       | 2,00                         | 1,48                      |
| e     | 1,06               | 0,53 | 1,59                       | 2,00                         | 1,48                      |
| f     | 1,06               | 0,53 | 1,59                       | 2,00                         | 1,48                      |
| 8 a   | 0,93               | 0,66 | 1,59                       | 1,41                         | 1,48                      |
| b     | 0,93               | 0,66 | 1,59                       | 1,41                         | 1,48                      |
| c     | 0,93               | 0,66 | 1,59                       | 1,41                         | 1,48                      |
| d     | 0,93               | 0,66 | 1,59                       | 1,41                         | 1,48                      |
| e     | 0,93               | 0,66 | 1,59                       | 1,41                         | 1,48                      |
| f     | 0,93               | 0,66 | 1,59                       | 1,41                         | 1,48                      |
| 9 a   | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,36                      |
| b     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,36                      |
| c     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,36                      |
| d     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,36                      |
| e     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,36                      |
| f     | 0,66               | 0,53 | 1,19                       | 1,24                         | 1,11                      |
| 10 a  | 0,93               | 0,53 | 1,46                       | 1,75                         | 1,36                      |
| b     | 0,93               | 0,53 | 1,46                       | 1,75                         | 1,36                      |
| c     | 0,93               | 0,53 | 1,46                       | 1,75                         | 1,36                      |
| d     | 0,80               | 0,53 | 1,33                       | 1,51                         | 1,24                      |
| e     | 0,80               | 0,53 | 1,33                       | 1,51                         | 1,24                      |
| f     | 0,80               | 0,53 | 1,33                       | 1,51                         | 1,24                      |



Tabela 31. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b,c,d,e,f) dos 10 grupos cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 2 de *Eupatorium laevigatum* (Comprimento total do complemento: 103,88  $\mu\text{m}$ ).

| Grupo | Braço cromossômico |      | Comprimento total | Proporção de braços | Comprimento relativo |
|-------|--------------------|------|-------------------|---------------------|----------------------|
|       | (L)                | (C)  |                   | (L/C)               | %                    |
| 1 a   | 1,33               | 1,06 | 2,39              | 1,25                | 2,30                 |
| b     | 1,33               | 1,06 | 2,39              | 1,25                | 2,30                 |
| c     | 1,20               | 1,06 | 2,26              | 1,13                | 2,17                 |
| d     | 1,20               | 0,93 | 2,13              | 1,29                | 2,05                 |
| e     | 1,06               | 0,93 | 1,99              | 1,14                | 1,91                 |
| f     | 1,06               | 0,93 | 1,99              | 1,44                | 1,91                 |
| 2 a   | 1,46               | 0,66 | 2,12              | 2,21                | 2,04                 |
| b     | 1,46               | 0,66 | 2,12              | 2,21                | 2,04                 |
| c     | 1,46               | 0,66 | 2,12              | 2,21                | 2,04                 |
| d     | 1,33               | 0,66 | 1,99              | 2,01                | 1,91                 |
| e     | 1,33               | 0,66 | 1,99              | 2,01                | 1,91                 |
| f     | 1,33               | 0,66 | 1,99              | 2,01                | 1,91                 |
| 3 a   | 1,46               | 0,80 | 2,26              | 1,82                | 2,17                 |
| b     | 1,20               | 0,66 | 1,86              | 1,82                | 1,79                 |
| c     | 1,20               | 0,66 | 1,86              | 1,82                | 1,79                 |
| d     | 1,20               | 0,66 | 1,86              | 1,82                | 1,79                 |
| e     | 1,06               | 0,66 | 1,72              | 1,61                | 1,65                 |
| f     | 1,06               | 0,66 | 1,72              | 1,61                | 1,65                 |
| 4 a   | 1,06               | 0,80 | 1,86              | 1,32                | 1,79                 |
| b     | 1,06               | 0,80 | 1,86              | 1,32                | 1,79                 |
| c     | 1,06               | 0,80 | 1,86              | 1,32                | 1,79                 |
| d     | 1,06               | 0,80 | 1,86              | 1,32                | 1,79                 |
| e     | 1,06               | 0,80 | 1,86              | 1,32                | 1,79                 |
| f     | 1,06               | 0,80 | 1,86              | 1,32                | 1,79                 |
| 5 a   | 1,33               | 0,53 | 1,86              | 2,51                | 1,79                 |
| b     | 1,20               | 0,53 | 1,73              | 2,26                | 1,66                 |
| c     | 1,20               | 0,53 | 1,73              | 2,26                | 1,66                 |
| d     | 1,06               | 0,53 | 1,59              | 2,00                | 1,53                 |
| e     | 1,06               | 0,53 | 1,59              | 2,00                | 1,53                 |
| f     | 1,06               | 0,53 | 1,59              | 2,00                | 1,53                 |
| 6 a   | 0,93               | 0,80 | 1,73              | 1,16                | 1,66                 |
| b     | 0,93               | 0,80 | 1,73              | 1,16                | 1,66                 |
| c     | 0,93               | 0,80 | 1,73              | 1,16                | 1,66                 |
| d     | 0,93               | 0,80 | 1,73              | 1,16                | 1,66                 |
| e     | 0,93               | 0,80 | 1,73              | 1,16                | 1,66                 |
| f     | 0,93               | 0,80 | 1,73              | 1,16                | 1,66                 |
| 7 a   | 0,80               | 0,80 | 1,60              | 1,00                | 1,54                 |
| b     | 0,80               | 0,80 | 1,60              | 1,00                | 1,54                 |
| c     | 0,80               | 0,80 | 1,60              | 1,00                | 1,54                 |
| d     | 0,80               | 0,80 | 1,60              | 1,00                | 1,54                 |
| e     | 0,80               | 0,80 | 1,60              | 1,00                | 1,54                 |
| f     | 0,80               | 0,80 | 1,60              | 1,00                | 1,54                 |
| 8 a   | 0,93               | 0,66 | 1,59              | 1,41                | 1,53                 |
| b     | 0,93               | 0,66 | 1,59              | 1,41                | 1,53                 |
| c     | 0,93               | 0,66 | 1,59              | 1,41                | 1,53                 |
| d     | 0,80               | 0,66 | 1,46              | 1,21                | 1,40                 |
| e     | 0,80               | 0,66 | 1,46              | 1,21                | 1,40                 |
| f     | 0,80               | 0,66 | 1,46              | 1,21                | 1,40                 |
| 9 a   | 0,93               | 0,53 | 1,46              | 1,75                | 1,40                 |
| b     | 0,93               | 0,53 | 1,46              | 1,75                | 1,40                 |
| c     | 0,93               | 0,53 | 1,46              | 1,75                | 1,40                 |
| d     | 0,93               | 0,53 | 1,46              | 1,75                | 1,40                 |
| e     | 0,93               | 0,53 | 1,46              | 1,75                | 1,40                 |
| f     | 0,93               | 0,53 | 1,46              | 1,75                | 1,40                 |
| 10 a  | 0,80               | 0,53 | 1,33              | 1,51                | 1,28                 |
| b     | 0,80               | 0,53 | 1,33              | 1,51                | 1,28                 |
| c     | 0,80               | 0,53 | 1,33              | 1,51                | 1,28                 |
| d     | 0,80               | 0,53 | 1,33              | 1,51                | 1,28                 |
| e     | 0,80               | 0,53 | 1,33              | 1,51                | 1,28                 |
| f     | 0,80               | 0,53 | 1,33              | 1,51                | 1,28                 |



Tabela 32. Medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos cromossomos (a,b,c,d,e,f) dos 10 grupos cromossômicos, considerando os braços longo (L) e curto (C) da célula 3 de *Eupatorium laevigatum* (Comprimento total do complemento: 92,54  $\mu\text{m}$ ).

| Grupo | Braço cromossômico |      | Comprimento total<br>(L+C) | Proporção de braços<br>(L/C) | Comprimento relativo<br>% |
|-------|--------------------|------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|
|       | (L)                | (C)  |                            |                              |                           |
| 1 a   | 1,06               | 0,93 | 1,99                       | 1,14                         | 2,15                      |
| b     | 1,06               | 0,93 | 1,99                       | 1,14                         | 2,15                      |
| c     | 1,06               | 0,80 | 1,86                       | 1,32                         | 2,01                      |
| d     | 1,06               | 0,80 | 1,86                       | 1,32                         | 2,01                      |
| e     | 1,06               | 0,80 | 1,86                       | 1,32                         | 2,01                      |
| f     | 1,06               | 0,80 | 1,86                       | 1,32                         | 2,01                      |
| 2 a   | 0,93               | 0,80 | 1,73                       | 1,16                         | 1,87                      |
| b     | 0,93               | 0,80 | 1,73                       | 1,16                         | 1,87                      |
| c     | 0,93               | 0,80 | 1,73                       | 1,16                         | 1,87                      |
| d     | 0,93               | 0,80 | 1,73                       | 1,16                         | 1,87                      |
| e     | 0,93               | 0,80 | 1,73                       | 1,16                         | 1,87                      |
| f     | 0,93               | 0,80 | 1,73                       | 1,16                         | 1,87                      |
| 3 a   | 1,20               | 0,53 | 1,73                       | 2,26                         | 1,87                      |
| b     | 1,06               | 0,66 | 1,72                       | 1,60                         | 1,86                      |
| c     | 1,06               | 0,66 | 1,72                       | 1,60                         | 1,86                      |
| d     | 1,06               | 0,53 | 1,59                       | 2,00                         | 1,72                      |
| e     | 1,06               | 0,53 | 1,59                       | 2,00                         | 1,72                      |
| f     | 1,06               | 0,53 | 1,59                       | 2,00                         | 1,72                      |
| 4 a   | 0,80               | 0,80 | 1,60                       | 1,00                         | 1,73                      |
| b     | 0,80               | 0,80 | 1,60                       | 1,00                         | 1,73                      |
| c     | 0,80               | 0,80 | 1,60                       | 1,00                         | 1,73                      |
| d     | 0,80               | 0,80 | 1,60                       | 1,00                         | 1,73                      |
| e     | 0,80               | 0,80 | 1,60                       | 1,00                         | 1,73                      |
| f     | 0,80               | 0,80 | 1,60                       | 1,00                         | 1,73                      |
| 5 a   | 0,93               | 0,66 | 1,59                       | 1,41                         | 1,72                      |
| b     | 0,93               | 0,66 | 1,59                       | 1,41                         | 1,72                      |
| c     | 0,93               | 0,66 | 1,59                       | 1,41                         | 1,72                      |
| d     | 0,93               | 0,66 | 1,59                       | 1,41                         | 1,72                      |
| e     | 0,93               | 0,66 | 1,59                       | 1,41                         | 1,72                      |
| f     | 0,93               | 0,66 | 1,59                       | 1,41                         | 1,72                      |
| 6 a   | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,57                      |
| b     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,57                      |
| c     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,57                      |
| d     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,57                      |
| e     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,57                      |
| f     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,57                      |
| 7 a   | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,57                      |
| b     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,57                      |
| c     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,57                      |
| d     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,57                      |
| e     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,57                      |
| f     | 0,80               | 0,66 | 1,46                       | 1,21                         | 1,57                      |
| 8 a   | 0,93               | 0,53 | 1,46                       | 1,75                         | 1,57                      |
| b     | 0,93               | 0,53 | 1,46                       | 1,75                         | 1,57                      |
| c     | 0,93               | 0,53 | 1,46                       | 1,75                         | 1,57                      |
| d     | 0,93               | 0,53 | 1,46                       | 1,75                         | 1,57                      |
| e     | 0,93               | 0,40 | 1,33                       | 2,32                         | 1,43                      |
| f     | 0,93               | 0,40 | 1,33                       | 2,32                         | 1,43                      |
| 9 a   | 0,80               | 0,53 | 1,33                       | 1,51                         | 1,43                      |
| b     | 0,80               | 0,53 | 1,33                       | 1,51                         | 1,43                      |
| c     | 0,80               | 0,53 | 1,33                       | 1,51                         | 1,43                      |
| d     | 0,80               | 0,53 | 1,33                       | 1,51                         | 1,43                      |
| e     | 0,80               | 0,53 | 1,33                       | 1,51                         | 1,43                      |
| f     | 0,80               | 0,53 | 1,33                       | 1,51                         | 1,43                      |
| 10 a  | 0,66               | 0,66 | 1,32                       | 1,00                         | 1,42                      |
| b     | 0,66               | 0,66 | 1,32                       | 1,00                         | 1,42                      |
| c     | 0,66               | 0,66 | 1,32                       | 1,00                         | 1,42                      |
| d     | 0,66               | 0,66 | 1,32                       | 1,00                         | 1,42                      |
| e     | 0,66               | 0,53 | 1,19                       | 1,24                         | 1,28                      |
| f     | 0,66               | 0,53 | 1,19                       | 1,24                         | 1,28                      |

Tabela 33. Comprimento ( $\bar{x} \pm S_x$ , em  $\mu\text{m}$ ) dos braços longo (L) e curto (C) dos 10 cromossomos das 3 células estudadas de *Eupatorium laevigatum*. Comprimento total médio do genoma: 16,78  $\mu\text{m}$ .

| Cromossomo | L               | C               | L+C             | L/C  | L+C/16,78 | Tipo |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|-----------|------|
| 1          | $1,19 \pm 0,03$ | $0,89 \pm 0,02$ | $2,08 \pm 0,04$ | 1,34 | 12,40     | m    |
| 2          | $1,14 \pm 0,05$ | $0,80 \pm 0,03$ | $1,94 \pm 0,04$ | 1,42 | 11,56     | m    |
| 3          | $1,16 \pm 0,02$ | $0,68 \pm 0,02$ | $1,84 \pm 0,04$ | 1,71 | 10,96     | sm   |
| 4          | $1,06 \pm 0,05$ | $0,73 \pm 0,02$ | $1,79 \pm 0,03$ | 1,45 | 10,67     | m    |
| 5          | $1,09 \pm 0,03$ | $0,61 \pm 0,01$ | $1,70 \pm 0,03$ | 1,79 | 10,13     | sm   |
| 6          | $0,88 \pm 0,01$ | $0,75 \pm 0,01$ | $1,63 \pm 0,03$ | 1,17 | 9,71      | m    |
| 7          | $0,88 \pm 0,03$ | $0,69 \pm 0,02$ | $1,57 \pm 0,06$ | 1,27 | 9,36      | m    |
| 8          | $0,91 \pm 0,01$ | $0,60 \pm 0,02$ | $1,51 \pm 0,02$ | 1,52 | 9,00      | m    |
| 9          | $0,83 \pm 0,01$ | $0,56 \pm 0,01$ | $1,39 \pm 0,02$ | 1,48 | 8,28      | m    |
| 10         | $0,77 \pm 0,02$ | $0,56 \pm 0,01$ | $1,33 \pm 0,01$ | 1,37 | 7,93      | m    |

### 3.5 Produção e germinabilidade de sementes

Estudos complementares para verificar a produção de sementes foram realizados em 7 plantas de *Eupatorium laevigatum* num total de 3632 ovários examinados, dos quais 1025 (28,2%) produziram sementes contendo embriões. Os resultados estão expressos na Tabela 34.

Os resultados dos testes de germinação de sementes retiradas de 7 plantas (50 sementes por planta) revelaram porcentagens variando de 20% (10 sementes) a 52% (26 sementes). Das 350 sementes testadas 117 (33,42%) germinaram, como indicado na Tabela 35 .





Tabela 34. Produção de sementes em *Eupatorium laevigatum*.

| Planta | Total de ovários<br>examinados | Sementes produzidas |      |
|--------|--------------------------------|---------------------|------|
|        |                                | Nº                  | %    |
| 1      | 641                            | 348                 | 54,3 |
| 2      | 517                            | 142                 | 27,5 |
| 3      | 506                            | 118                 | 23,3 |
| 4      | 506                            | 149                 | 29,4 |
| 5      | 477                            | 85                  | 17,8 |
| 6      | 497                            | 96                  | 19,3 |
| 7      | 488                            | 87                  | 17,8 |
| Total  | 3632                           | 1025                | 28,2 |

Tabela 35. Germinabilidade de sementes em *Eupatorium laevigatum* (50 sementes por planta).

| Planta | Sementes germinadas |       |
|--------|---------------------|-------|
|        | Nº                  | %     |
| 1      | 43                  | 26    |
| 2      | 26                  | 52    |
| 3      | 20                  | 40    |
| 4      | 10                  | 20    |
| 5      | 11                  | 22    |
| 6      | 19                  | 38    |
| 7      | 18                  | 36    |
| Total  | 117                 | 33,42 |

#### IV. DISCUSSÃO

A família Compositae está no topo de uma lista de oito famílias nas quais há pelo menos 10 gêneros com espécies que se reproduzem apomiticamente. Os estudos embriológicos, segundo Czapik (1996), fornecem a documentação total dos eventos apomíticos. Segundo esta autora, nas Compositae processos apomíticos têm sido registrados em 2,9% dos gêneros. Porém, há registros embriológicos publicados para somente 11,1% dos gêneros na família. Assim, o número de apomíticos na família Compositae pode ser bem maior. Os três tipos de apomixia podem ser encontrados nas Compositae: embrionia adventícia, diplosporia e aposporia (Davis, 1966).

Embora há muito tempo uma alta incidência de apomixia seja conhecida no gênero *Eupatorium* (Nygren, 1954; Fryxell, 1957), surpreendentemente, pouca pesquisa tem sido realizada sobre a ocorrência do fenômeno no gênero. Números cromossômicos de algumas espécies brasileiras foram determinados (Coleman, 1968; Turner & Irwin, 1960). 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 a desenvolvimento autônomo do endosperma. Sparvoli (1960) demonstrou a presença de diplosporia também em *E. riparium*, uma espécie italiana. 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. kleinoide*s, espécie tetraplóide ( $n=20$ ), do sul do Brasil, em que eles observaram irregularidades na meiose da microsporogênese. Rozenblum *et al.* (1988) constatarem grandes anormalidades durante a microsporogênese em *E. tanacetifolium*, uma espécie argentina demonstrada, por estudos embriológicos, como sendo diplospórica autônoma.

Sullivan (1976) num estudo de 15 espécies norte-americanas de *Eupatorium* determinou oito como sendo diplóides, três triplóides e quatro tetraplóides. Todas as espécies diplóides mostraram normalidade de meiose, enquanto as poliplóides exibiram irregularidades meióticas. Ela indicou as espécies diplóides como sendo sexuadas e as poliplóides, apomíticas.





Coleman & Coleman (1984; 1988) e Bertasso-Borges & Coleman (1998) realizaram estudos detalhados de agamospermia em quatro espécies triplóides ( $2n=3x=30$ ) brasileiras: *E. bupleurifolium*, *E. callilepis*, *E. squalidum* e *E. pauciflorum*. O estudo da megasporogênese e formação do saco embrionário nestas espécies revelou que apenas *E. bupleurifolium* é apospórica, enquanto as outras espécies são diplospóricas com formação autônoma do endosperma. O mesmo padrão de desenvolvimento foi observado por Coleman (1989) em *E. odoratum*, uma espécie hexaplóide ( $2n=6x=60$ ). *E. inulaefolium* (Coleman, 1991) e *E. intermedium* (Bertasso-Borges & Coleman, 1998) foram determinadas como sendo tetraplóide ( $2n=4x=40$ ) e diplóide ( $2n=2x=20$ ), respectivamente, e sexuadas.

Duas das três espécies estudadas neste trabalho, *E. purpurascens* e *E. laevigatum*, demonstraram a ocorrência regular de embriões em óvulos provenientes de botões ainda fechados (Tabelas 15 e 26) e, portanto, sem possibilidade de terem sido polinizados, o que é um forte indício de apomixia. A ausência de início de embriões diretamente a partir de células somáticas (embrionia adventícia) ou a formação de saco embrionário a partir de uma célula somática (aposporia) levou à exclusão de ser apomixia em *E. purpurascens* e *E. laevigatum* de um destes tipos. A não constatação de díades e tétrades de megásporos sugere ausência ou modificação da meiose na megasporogênese. Nestas espécies, o saco embrionário maduro resulta de três divisões mitóticas sucessivas do núcleo do megasporócito que funciona diretamente como megásporo (Figuras 8a e 13a), o que permite concluir que o tipo de apomixia nas duas espécies é a diplosporia.

O tipo de diplosporia nas duas espécies 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, e na ausência de parede celular separando os dois núcleos iniciais, característica do tipo Taraxacum. Diplosporia do tipo Antennaria foi registrada previamente para outras espécies do gênero *Eupatorium*: *E. glandulosum* (Holmgren, 1919), *E. riparium* (Sparvoli, 1960), *E. callilepis* (Coleman & Coleman, 1984), *E. squalidum* (Coleman & Coleman, 1988), *E. tanacetifolium* (Rozenblum *et al.*, 1988), *E. odoratum* (Coleman, 1989) e *E. pauciflorum* (Bertasso-Borges & Coleman, 1998).

Em *E. laevigatum*, a presença de endosperma em óvulos provenientes de flores em fases iniciais de desenvolvimento e em pré-antese (Tabela 26) indica que sua formação é do tipo autônoma, ou seja, completamente independente de fecundação. O desenvolvimento autônomo do endosperma ocorre na maioria das



espécies apomíticas da família Compositae, enquanto em outras famílias é uma condição esporádica (Nogler, 1984a).

Por outro lado, em *Eupatorium purpurascens*, a presença de endosperma não foi constatada em óvulos de flores em fases iniciais de desenvolvimento floral e mesmo em pré-antese sua freqüência foi menor (4,86%, Tabela 15) em comparação à *E. laevigatum* (24,29%, Tabela 26). No caso de *E. purpurascens* cerca de 83% dos óvulos em pré-antese apresentavam ainda núcleos polares ou núcleo central não divididos, o que sugeriu a possibilidade de uma proporção significativa de pseudogamia (necessidade de fecundação do núcleo central para formação do endosperma). Porém, a constatação de que os grãos de pólen, embora viáveis (Tabela 17), não são funcionais em consequência dos núcleos masculinos não descenderem no tubo polínico (Figura 11d) permite descartar a possibilidade de pseudogamia.

A iniciação autônoma do endosperma pode ser a partir de núcleos polares livres ou a partir do núcleo central (Gustafsson, 1946). Em *Eupatorium purpurascens* e *E. laevigatum* os dois núcleos polares se fundem e o endosperma se inicia a partir do núcleo central resultante (Figuras 9a e 14b; Tabelas 15 e 26). Iniciação autônoma do endosperma a partir do núcleo central também foi constatada para *E. squalidum* (Coleman & Coleman, 1988) e *E. pauciflorum* (Bertasso-Borges & Coleman, 1998), enquanto em *E. callilepis* (Coleman & Coleman, 1984) e *E. odoratum* (Coleman, 1989) se dá a partir dos núcleos polares.

Em *E. purpurascens* e *E. laevigatum* o desenvolvimento do embrião precede o início do endosperma. Segundo Vijayaraghavan & Prabhakar (1984) isto é de interesse fisiológico pois evidencia que o desenvolvimento do embrião não é mantido por nutrientes vindos do endosperma, mas por nutrientes transferidos para o saco embrionário a partir de tecidos próximos.

Em *Eupatorium laevigatum* aproximadamente 25% dos óvulos em fase de pré-antese ainda apresentavam oosferas (Tabela 26) e em *E. purpurascens* cerca de 63% (Tabela 15). Porém, a constatação de embrião em cerca de 57% dos óvulos de *E. laevigatum* e em 25% dos óvulos de *E. purpurascens* em pré-antese suporta a ocorrência de embrionia precoce e apomixia no material estudado. Considerando que uma parte significativa dos óvulos analisados em pré-antese teria sido coletada até a várias horas antes da antese, a porcentagem de óvulos contendo oosferas no momento da antese teria sido menor. Durante a antese, apenas cerca de 10% dos óvulos examinados em *E. laevigatum* (Tabela 26) e 2%

em *E. purpurascens* (Tabela 15) apresentavam oosferas. Estes resultados indicam que a embrionia precoce seria uma forte barreira à reprodução sexuada em ambas as espécies. Nenhum dos 2074 óvulos examinados em *E. laevigatum* e 1757 em *E. purpurascens*, nos três estágios florais, revelou a presença de tubo polínico, embora 687 (33,12%) óvulos em *E. laevigatum* e 660 (37,56%) em *E. purpurascens* contivessem embrião. Portanto, a constatação de embrionia precoce aliada à ausência de meiose redutiva e de tubos polínicos indica que o material examinado das duas espécies reproduz-se apomiticamente.

A análise da formação do saco embrionário em diferentes estágios florais em *Eupatorium polystachium* demonstrou a presença de díades e tétrades de megásporos (Tabela 1, Figura 4b), o que indica a ocorrência regular de meiose redutiva. A baixa frequência de díades e tétrades de megásporos pode ser explicada pela curta duração destas fases. Embrião e endosperma foram presentes apenas em óvulos provenientes de flores em antese, o que indica que polinização e fertilização da oosfera e do núcleo central são essenciais para o seu desenvolvimento. A baixa frequência de óvulos contendo tanto embrião como núcleo central (2,74%) sustenta que oosfera e núcleo central começam a se dividir quase que simultaneamente. A iniciação do endosperma em *E. polystachium* ocorreria através da união do núcleo central com um dos núcleos generativos. Como o núcleo central é diplóide, o endosperma originado será  $3n=30$ .

Resultados semelhantes foram obtidos para *Eupatorium inulaefolium* ( $2n=4x=40$ ; Coleman, 1991) e *E. intermedium* ( $2n=2x=20$ ; Bertasso-Borges & Coleman, 1998). Nestas duas espécies foi constatada a presença regular de díades e tétrades de megásporos, atestando a ocorrência de meiose redutiva, bem como a ausência de embrionia precoce. Ambas as espécies foram determinadas como reproduzindo-se exclusivamente por via sexuada, no material estudado.

Em espécies sexuadas a fertilidade de um indivíduo depende da normalidade do processo meiótico. Estudos em um vasto número de espécies têm demonstrado que irregularidades meióticas levam à esterilidade do pólen e, conseqüentemente, à baixa produção de sementes (Consolaro *et al.*, 1996).

A análise da microsporogênese em *Eupatorium polystachium* ( $2n=2x=20$ ) revelou pareamento cromossômico normal em diacinese com a ocorrência uniforme de bivalentes, sendo normais todos os aspectos da microsporogênese e formação do pólen. A regularidade da microsporogênese e formação de pólen indicam um alto grau de fertilidade masculina para o material



estudado, o que foi confirmado pela alta porcentagem de grãos corados (Figura 6e, Tabela 2). *E. inulaefolium* (Coleman, 1991) e *E. intermedium* (Bertasso-Borges & Coleman, 1998) também apresentaram microsporogênese e formação de pólen normais. A semelhança de resultados entre estas espécies também diz respeito à ocorrência de polinização. Nas três espécies há uma frequência alta de grãos de pólen sobre os estigmas (91,33% em *E. polystachium*, 71,2% em *E. inulaefolium* e 74,4% em *E. intermedium*), o que indica polinização regular.

Em espécies apomíticas autônomas, irregularidades durante a meiose masculina são um fenômeno comum, considerando que não há necessidade de fertilização da oosfera e dos núcleos polares para o início do embrião e endosperma. Já as espécies pseudogâmicas não apresentam muitas anormalidades meióticas, visto que a produção de sementes depende da presença de pólen viável capaz de fecundar os núcleos polares e dar início ao endosperma (Asker & Jerling, 1992).

*Eupatorium callilepis* (Coleman & Coleman, 1984), *E. tanacetifolium* (Rozenblum *et al.*, 1988) e *E. squalidum* (Coleman & Coleman, 1988) são triplóides ( $2n=3x=30$ ) e diplospóricas autônomas, enquanto *E. bupleurifolium* (Coleman & Coleman, 1984) também é triplóide ( $2n=3x=30$ ) porém, apospórica autônoma. As três espécies apresentam distúrbios durante a microsporogênese relacionados a anormalidades de pareamento, com formação de univalentes, bivalentes e trivalentes, com a conseqüente produção de cromossomos retardatários, núcleos cromossômicos não balanceados, formação de micronúcleos e esterilidade do pólen.

*Eupatorium odoratum*, hexaplóide ( $2n=6x=60$ ) e diplospórica autônoma, apresentou produção de pólen extremamente reduzida em conseqüência da degeneração do tecido esporógeno antes do início da meiose. Porém, as poucas células observadas em diacinese demonstraram, essencialmente, as mesmas irregularidades observadas nas espécies triplóides (Coleman, 1989). *E. pauciflorum*, triplóide ( $2n=3x=30$ ) e diplospórica autônoma, revelou total ausência de microsporócitos em conseqüência da degeneração do tecido esporógeno (Bertasso-Borges & Coleman, 1998). Assim, irregularidades meióticas são constantes nas espécies apomíticas de *Eupatorium*. Existem diferenças entre estas espécies quanto ao nível de ploidia (triploidia *versus* hexaploidia) e iniciação do saco embrionário não reduzido (diplosporia *versus* aposporia). Porém, todas têm em comum a formação autônoma do endosperma.



O material examinado de *Eupatorium laevigatum* demonstrou anormalidades no pareamento cromossômico durante a diacinese atestadas pela presença de univalentes, bivalentes, trivalentes e polivalentes superiores (Figuras 15a, b, c). Cromossomos retardatários durante a anáfase I foram constantes (Figura 15d) e a perda de univalentes resultou na formação de micronúcleos na primeira e segunda divisão (Figuras 15e, f). As anormalidades meióticas resultaram em alta frequência de tétrades e díades com ou sem micrósporos supernumerários (Figuras 16a, b, Tabela 27). Núcleos de restituição não foram observados, mas a presença de díades de micrósporos sugere sua ocorrência. Em consequência destas anormalidades a viabilidade do pólen foi extremamente baixa (4,0%; Tabela 28, Figura 16c). A escassez de pólen nos estigmas (Tabela 29) indica infrequência de polinização. Estes dois fatores sugerem a reprodução sexuada ser extremamente rara, senão ausente, no material estudado, mesmo que alguns óvulos ainda com oosferas estejam disponíveis durante a antese. Em *E. laevigatum*, diplosporia assegura a produção de embrião e o desenvolvimento autônomo do endosperma torna a esterilidade masculina tolerável.

Estudos de microsporogênese em *Eupatorium purpurascens* mostraram a ocorrência regular de univalentes, bivalentes, trivalentes e polivalentes superiores durante diacinese e metáfase (Figuras 10a, b, c, d) e a presença de cromossomos retardatários durante anáfase I (Figura 10e) que podem ou não ser englobados em um ou nos dois núcleos. As irregularidades de pareamento e a presença de cromossomos retardatários resultaram em anáfases não balanceadas (figura 10f), corroborada pela produção de micrósporos supernumerários, bem como pela presença de tétrades com micrósporos de tamanhos distintos (Figura 11b, abaixo). A formação de tétrades de micrósporos foi menos irregular quando comparada à *E. laevigatum* (Tabela 16), porém não excluindo a prevalência de núcleos geneticamente não balanceados.

Os estudos de meiose em *Eupatorium purpurascens* sugerem um alto grau de esterilidade masculina para o material examinado. Entretanto, a viabilidade do pólen foi inesperadamente alta (83,7%, Tabela 17). A alta frequência dos grãos de pólen depositados nos pistilos (Tabela 18) indica a ocorrência de polinização. Porém, a análise de 497 grãos germinados revelou que todos estavam ainda na condição trinucleada (Figura 11d). Em um estudo comparativo foram observados 826 grãos de pólen germinados sobre estigmas de *E. polystachium*, uma espécie sexuada, estando todos desprovidos de núcleos. A viabilidade dos grãos de pólen

de *E. purpurascens* indica alta tolerância à não balanceamento genético. Entretanto, embora viáveis, os grãos de pólen não são funcionais, em consequência da incapacidade dos núcleos masculinos entrarem no tubo polínico. Heslop-Harrison & Heslop-Harrison (1987, 1989, 1997) demonstraram que o movimento dos núcleos generativos para dentro do tubo polínico envolve a interação entre fibrilas de miosina e actina, porém o mecanismo de funcionamento deste sistema não é ainda plenamente esclarecido. Em *E. purpurascens*, a formação de sementes em populações naturais é alta (57,86%, Tabela 24) devido à reprodução apomítica.

A descrição das características do conjunto cromossômico de uma espécie é conhecida como cariótipo. Os cariótipos são classificados em dois tipos: simétricos e assimétricos. Segundo Stebbins (1971), um cariótipo simétrico é aquele em que os cromossomos são todos aproximadamente do mesmo tamanho e apresentam centrômeros medianos e submedianos. O aumento da assimetria, ou seja, uma maior variação nestes parâmetros pode ocorrer através de uma alteração na posição do centrômero de mediano para subterminal ou terminal ou pelo acúmulo de diferenças no tamanho relativo entre os cromossomos, tornando o cariótipo mais heterogêneo.

Os estudos de cariótipo em *Eupatorium polystachium* indicaram a presença no complemento de dois genomas morfologicamente indistinguíveis, caracterizando a espécie como diplóide ( $2n=2x=20$ , Tabelas 4 a 12, Figura 7). No complemento foi observada a presença de dois cromossomos SAT. A constatação de dois pares de cromossomos subterminais, bem como uma discreta variação no tamanho dos cromossomos, permite classificar o cariótipo como sendo relativamente assimétrico. *E. intermedium* (Bertasso-Borges & Coleman, 1998) também foi demonstrada como sendo diplóide.

A caracterização de espécies apomíticas como auto ou aloploplóides é, geralmente, realizada com base no pareamento cromossômico durante a meiose da microsporogênese. No caso das espécies pseudogâmicas este procedimento é geralmente viável em função da normalidade meiótica. No entanto, a situação muda no caso das espécies autônomas, pois estas tendem a suprimir o pareamento cromossômico dos homólogos. Nestes casos, estudos de cariótipo tornam-se imprescindíveis para se distinguir entre auto e aloploidia.

No material estudado de *Eupatorium purpurascens* e *E. laevigatum*, os estudos de cariótipo indicaram a presença de seis genomas morfologicamente semelhantes no complemento, caracterizando ambas as espécies como



autohexaplóides ( $2n=6x=60$ ; Tabelas 19 a 23, Figura 12 e Tabelas 30 a 33, Figura 17, respectivamente). Os cariótipos destas espécies podem ser classificados como simétricos, pois a variação de tamanho entre os cromossomos é gradativa e os centrômeros são medianos e submedianos. King *et al.* (1976) registraram  $n=20$  para o material de *E. laevigatum* (como sendo *Chromolaena laevigata* (Lam.) K. & R.) coletado no Equador, enquanto Watanabe *et al.* (1995) apontaram  $2n=50$  para o material proveniente da Argentina.

Asker & Jerling (1992) afirmaram que espécies apomíticas são, em geral, de origem alopoliplóide. No entanto, Grimanelli *et al.* (1998) indicaram origem autopoliplóide para algumas linhagens de *Tripsacum*. Da mesma forma como em *Eupatorium purpurascens* e *E. laevigatum*, outras espécies apomíticas de *Eupatorium* têm sido caracterizadas como autopoliplóides: *E. squalidum* ( $2n=3x=30$ ; Coleman & Coleman, 1988), *E. odoratum* ( $2n=6x=60$ ; Coleman, 1989) e *E. pauciflorum* ( $2n=3x=30$ ; Bertasso-Borges & Coleman, 1998).

O presente trabalho estudou o modo de reprodução de três espécies de *Eupatorium* sob vários aspectos, incluindo embriologia, meiose e microgametogênese, cariótipo e fertilidade feminina e masculina. O conjunto dos resultados deixa claro que *E. polystachium* é espécie sexuada, enquanto *E. purpurascens* e *E. laevigatum* reproduzem-se através de agamospermia. As evidências que suportam esta conclusão em *E. purpurascens* e *E. laevigatum* são: não ocorrência de meiose reducional durante a megasporogênese, formação precoce de embrião e endosperma, esterilidade masculina, ausência de polinização (*E. laevigatum*) e natureza hexaplóide da espécie.



## V. RESUMO

Este estudo teve por objetivo investigar o modo de reprodução e a citogenética de três espécies do gênero *Eupatorium*: *E. polystachium* Sprengel, *E. purpurascens* Schultz-Bip e *E. laevigatum* Lam. (Compositae) e envolveu as seguintes etapas: megasporogênese e desenvolvimento do gametófito feminino, estudo da microsporogênese e formação de grãos de pólen, análise da viabilidade dos grãos de pólen, verificação da ocorrência de polinização, análise do cariótipo e determinação da produção e germinabilidade de sementes. O material de *E. polystachium* utilizado nesta investigação foi coletado de populações naturais no município de Mirassol, SP. Os estudos embriológicos foram realizados através do método de clarificação de óvulos, utilizando-se botões florais previamente fixados em FAA. A análise da formação do saco embrionário em diferentes estágios florais demonstrou a presença de díades e tétrades de megásporos, o que indica a ocorrência regular de meiose reductiva. O saco embrionário maduro, com 8 núcleos, é do tipo Polygonum. Embrião e endosperma foram presentes apenas em óvulos provenientes de flores já em antese, o que indica que polinização e fertilização da oosfera e do núcleo central são essenciais para o seu desenvolvimento. A microsporogênese em *E. polystachium* foi estudada através da técnica de esmagamento de anteras, utilizando-se botões florais fixados em solução de Carnoy e corados em carmim acético. A normalidade de pareamento foi evidente em diacinese com a ocorrência uniforme de bivalentes, sendo normais todos os aspectos da microsporogênese e formação de pólen, o que indica um alto grau de fertilidade masculina no material estudado. A análise da viabilidade dos grãos de pólen formados foi estudada através de coloração com azul de algodão e revelou que 99,68% de 2500 grãos analisados se mostraram corados e, portanto, viáveis. Estudos complementares sobre a ocorrência de polinização envolveram contagens do número de grãos de pólen sobre estigmas e revelaram que a partir de 173 pistilos examinados 91,33% apresentaram grãos de pólen, numa média de 20,06 grãos por pistilo. Uma análise de 826 grãos de pólen germinados demonstrou que todos os grãos apresentaram-se desprovidos de núcleos indicando que os núcleos masculinos foram liberados através do tubo polínico. Os estudos de cariótipo em *E. polystachium* foram baseados na análise de 8 metáfases obtidas de pontas de raízes pré-tratadas em oxiquinoleína (0,002M), fixadas em solução de Carnoy, hidrolisadas em HCl 1N e coradas em carmim acético. Medidas feitas do



comprimento total de cada cromossomo, dos braços longo e curto e da proporção dos braços permitiram o reconhecimento de dois genomas morfologicamente indistinguíveis no complemento, caracterizando a espécie como diplóide ( $2n=2x=20$ ). Quanto ao tamanho, os cromossomos medem de  $3,59 \mu\text{m}$  a  $4,93 \mu\text{m}$ , sendo possível observar 7 pares medianos, 1 par submediano e 2 pares subterminais. A produção de sementes foi analisada em 7 plantas num total de 2265 ovários examinados dos quais 33,02% produziram sementes contendo embriões. Os resultados dos testes de germinação de sementes retiradas de 4 plantas revelaram que 48,25% germinaram. O material de *E. purpurascens* utilizado neste estudo foi coletado de populações naturais nos municípios de Mirassol e São José do Rio Preto, SP, enquanto o material de *E. laevigatum* foi obtido somente no município de Mirassol, SP. Os estudos embriológicos nas duas espécies revelaram ausência total de formação de díades e tétrades de megásporos e, portanto, de meiose reductiva. O megasporócito funciona diretamente como megásporo. O saco embrionário maduro é do tipo Polygonum. A presença de embrião e/ou endosperma em óvulos provenientes de flores fechadas e, portanto, sem possibilidade de terem sido polinizadas é um forte indício de apomixia. A origem do saco embrionário diretamente do megasporócito permite concluir que o tipo de apomixia envolvido é a diplosporia. O desenvolvimento do endosperma é autônomo. A análise da microsporogênese nas duas espécies demonstrou anormalidades no pareamento cromossômico resultando na formação de univalentes, bivalentes, trivalentes e polivalentes superiores, com conseqüente produção de cromossomos retardatários, núcleos cromossômicos não balanceados, formação de micronúcleos e esterilidade do pólen. Em *E. laevigatum*, em conseqüência destas anormalidades, a porcentagem de grãos de pólen viáveis foi extremamente baixa (4,0% de 3000 grãos analisados). A ocorrência de polinização nesta espécie foi estudada para 181 pistilos, sendo que 58% apresentaram grãos de pólen, numa média de 1,04 grãos de pólen por pistilo, o que sustenta a baixa ocorrência de polinização efetiva. Em *E. purpurascens*, no entanto, apesar dos estudos meióticos apontarem um alto grau de esterilidade masculina, a porcentagem de grãos de pólen viáveis foi alta (83,7% de 3000 grãos analisados). Estudos sobre a ocorrência de polinização revelaram que, a partir de 147 pistilos examinados, 99,3% apresentaram grãos de pólen, numa média de 34,16 grãos por pistilo. Porém, outra análise revelou que 497 grãos de pólen germinados, com o tubo polínico claramente visível, permaneciam na condição trinucleada, evidenciando que embora viáveis os grãos de pólen são não



funcionais em consequência da incapacidade dos núcleos masculinos entrarem no tubo polínico. Os estudos de cariótipo foram baseados na análise de três metáfases em *E. laevigatum* e quatro em *E. purpurascens*, seguindo-se a mesma metodologia utilizada para *E. polystachium*. Os resultados indicam a presença de seis genomas morfológicamente semelhantes no complemento, caracterizando ambas as espécies como autohexaplóides ( $2n=6x=60$ ). Em *E. purpurascens* o comprimento total cromossômico variou de  $1,39 \mu\text{m}$  a  $2,18 \mu\text{m}$ , sendo todos os cromossomos medianos. Em *E. laevigatum*, o comprimento total cromossômico variou de  $1,33 \mu\text{m}$  a  $2,08 \mu\text{m}$ , sendo possível observar 8 cromossomos medianos e 2 submedianos. A produção de sementes foi analisada em 3 plantas de *E. purpurascens* num total de 2935 ovários examinados, dos quais 56,86% produziram sementes contendo embriões. Os resultados dos testes de germinação de sementes retiradas de 3 plantas revelaram que 44% germinaram. Em *E. laevigatum*, a produção de sementes foi analisada para 7 plantas, num total de 3632 ovários examinados, dos quais 28,2 % produziram sementes contendo embriões. Os resultados dos testes de germinação de sementes retiradas de 7 plantas revelaram que 33,42% germinaram. Com base no material estudado concluímos que *E. polystachium* é espécie sexuada, enquanto *E. purpurascens* e *E. laevigatum* são apomíticas.

## VI. SUMMARY

The objective of this study was to investigate the mode of reproduction and the cytogenetics of three species of the genus *Eupatorium*: *E. polystachium* Sprengel, *E. purpurascens* Schultz-Bip and *E. laevigatum* Lam. (Compositae) and included the following stages: megasporogenesis and development of the female gametophyte, study of microsporogenesis and pollen grain formation, analysis of pollen viability, verification of the occurrence of pollination, analysis of karyotype and determination of seed production and germinability. The material of *E. polystachium* used in this investigation was collected from natural populations in the Município of Mirassol, SP. The embryological studies were done using the method of ovule clarification, from buds previously fixed in FAA. The analysis of embryo sac formation, in different floral stages demonstrated the presence of dyads and tetrads of megaspores, which indicates regular occurrence of reductive meiosis. The mature embryo sac, with 8 nucleus, is of the Polygonum type. Embryo and endosperm were present only in ovules from opened florets, which indicates that pollination and fertilization of the egg and of the central nucleus are essential for their development. Microsporogenesis in *E. polystachium* was studied using the smear technique of anthers from buds fixed in Carnoy's solution and stained in aceto-carmin. The normality of pairing was evident during diakinesis, with uniform occurrence of bivalents, and normality of all subsequent aspects of microsporogenesis and pollen formation, which indicates a high degree of male fertility in the material studied. Pollen viability was determined by staining with cotton blue-lactophenol and revealed that 99.68% from 2500 grains were stained and, therefore, viable. Complementary studies of the occurrence of pollination were done by counts of the number of pollen grains occurring on stigmas and revealed that of 173 pistils examined, 91.33% had pollen grain, with a mean of 20.06 grains. An analysis of 826 germinated pollen grain demonstrated that all the grains were devoid of nucleus, which indicated that the male nucleus were release into the pollen tube. Karyotype studies in *E. polystachium* were based on analysis of eight cells from root tips pretreated with oxyquinoline (0.002M), fixed in Carnoy's solution, hydrolised in HCl 1N and stained in aceto-carmin. Measurements of total length of each chromosome, long arm, short arm and ratio arm, permitted the recognition of two morphologically indistinct genomes in the complement, which characterizes the species as a diploid ( $2n=2x=20$ ). Metaphase chromosomes were determined to measure from 3.59  $\mu\text{m}$  to 4.93  $\mu\text{m}$ .



The complement showed seven pairs of median chromosomes, one pair submedian and two pairs subterminal. Seed production was determined in 2265 ovaries from 7 plants, and showed that 33.02% produced seeds with embryos. The results of germination tests, from 4 plants, revealed that 48.25% germinated. The material of *E. purpurascens* used in this study was collected from natural populations in the Municípios of Mirassol and São José do Rio Preto, SP, while the material of *E. laevigatum* was collected only in the Município of Mirassol, SP. The embryological studies, in the two species, revealed the complete absence of dyads and tetrads of megaspores and, therefore, of reductive meiosis. The megasporocyte functions directly as the megaspore. The mature embryo sac is of the Polygonum type. The presence of embryo and/or endosperm in ovules from unopened florets and, therefore, without possibilities of pollinization, is a strong evidence for apomixis. The origin of the embryo sac directly from the megasporocyte permits to conclude that the type of apomixis is the diplospory. Endosperm development is autonomous. The analysis of microsporogenesis, in the two species, demonstrated abnormalities in chromosome pairing, which result in the formation of univalents, bivalents, trivalents and higher polyvalents, with consequent production of lagging chromosomes, unbalanced nuclei, micronuclei and sterile pollen. In *E. laevigatum*, as consequence of these abnormalities, the rate of viable pollen grains was low (4.0% of 3000 pollen grains). The occurrence of pollination was studied for 181 pistils and 58% showed the presence of pollen grains. The mean number of grains on these pistils was 1.04, which sustain the poor occurrence of efetive pollination. However, in *E. purpurascens*, although the meiotic studies indicated a high degree of male sterility, the rates of viable pollen grains was high (83.7% of 3000 pollen grains). Studies of the occurrence of pollination revealed that, from 147 pistils examined, 99.3% presented pollen grains, in a mean of 34.16 grains. Nevertheless, another analysis showed that 497 germinated pollen grains, with clearly visible tube, remain in the trinucleated condition, which evidenced that, although viable, the pollen grains are nonfunctional as a consequence of the male nuclei failing to enter the pollen tube. Karyotype studies were based on analysis of three metaphases in *E. laevigatum* and four in *E. purpurascens*, following the same methods used in *E. polystachium*. The results indicate the presence of six morphologically similar genomes in the complement, which characterizes the two species as autohexaploids ( $2n=6x=60$ ). In *E. purpurascens*, total length chromosome ranges from 1.39  $\mu\text{m}$  to 2.18  $\mu\text{m}$ , and all chromosomes are median. In *E. laevigatum*, total length chromosome ranges from



1.33  $\mu\text{m}$  to 2.08  $\mu\text{m}$ , and eight chromosomes are median and two are submedian. Seed production was determined in 3 plants of *E. purpurascens*, and of a total of 2935 ovaries examined showed that 56.86% produced seeds with embryos. Germination tests revealed that 44% germinated. In *E. laevigatum*, seed production was determined using seeds from 7 plants. A total of 3632 ovaries were examined and 28.2% produced seeds with embryos. Germination tests revealed that 33.42% germinated. On the basis of these studies it is concluded that *E. polystachium* is a sexual species while *E. purpurascens* and *E. laevigatum* are apomictics.





## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTS, M. G. M., DIRKSE, W. G., STLEKEMA, W. J., PEREIRA, A. Transposons tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. **Nature**, v. 363, p. 715-717, 1993.
- AKERBERG, E. Apomictic and sexual seed formation in *Poa pratensis*. **Hereditas**, v. 25, p. 359-370, 1939.
- 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**. Minneapolis: Burgess Publishing Co., 1952. 250p.
- ASKER, S. Apomixis and sexuality in the *Potentilla argentea* complex. III. Euploid and aneuploid derivatives (including trisomics) of some 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: ASKER, S. **Plant Biosystematics**. Canada: Academic Press, 1984. p.237-248.
- ASKER, S. Genetics of apomixis mechanisms. In: KHUSH, G. S. (ed). **Apomixis: exploiting hybrid vigor in rice**. Manila: International Rice Research Institute, 1994. p. 39-42.
- ASKER, S., JERLING, L. **Apomixis in Plants**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 298p.
- BARA, I. I. Reproduction - a factor of plant evolution. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 58, p. 127-139, 1989.
- BARCACCIA, G., TAVOLETTI, S., FALCINELLI, M. VERONESI, F. Environmental influences on the frequency and viability of meiotic and apomeiotic cells of a diploid mutant of alfafa. **Crop Sci.**, v. 37, p. 70-76, 1997.
- BARROSO, G. M., PEIXOTO, L. A., COSTA, G. C., ICHASO, F. C. L., GUIMARÃES, F. E., LIMA, C. H. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, Viçosa: Impr. Univ., v. 3, 1986. 326p.

- BASHAW, E. C., HANNA, W. W. Apomictic reproduction. In: CHAPMANN, G. P. (ed) **Reproductive versatility in the grasses**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p. 100-130.
- BAYER, R. J. Patterns of isozyme variation in the *Antennaria rosea* polyploid agamic complex. **Systematic Botany**, v. 14, p. 389-397, 1989.
- BAYER, R. J., CRAWFORD, D. J. Allozyme divergence among five diploid species of *Antennaria* and their allopolyploid derivatives. **Am. J. Bot.**, v. 68, p. 1342-1349, 1986.
- BEDINGER, P. The remarkable biology of pollen. **The Plant Cell**, v. 4, p. 879-887, 1992.
- BERTASSO-BORGES, M. S., COLEMAN, J. R. Embryology and cytogenetics of *Eupatorium pauciflorum* and *E. intermedium* (Compositae). **Genet. Mol. Biol.**, v. 21, p. 507-514, 1998.
- BIERZYCHUDEK, P. Environmental sensitivity of sexual and apomictic *Antennaria*: do apomicts have general-purpose genotypes? **Evolution**, v. 43, p. 1456-1466, 1989.
- BIRARI, S. P. Apomixis and sexuality in *Themeda* Forssk. at different ploidy levels (Gramineae). **Genetica**, v. 54, p. 133-139, 1980.
- BURSON, B. L. Cytological mechanisms of apospory and diplospory. In: KHUSH, G. S. (ed). **Apomixis: exploiting hybrid vigor in rice**. Manila: International Rice Research Institute, 1994. p. 35-38.
- BURTON, G. W. Effect of environment on apomixis in bahiagrass. **Crop Science**, v. 22, p. 109-111, 1982.
- BURTON, G. W., 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.
- CALZADA, J.- P. V., CRANE, C. F., STELLY, D. M. Apomixis: the asexual revolution. **Science**, v. 274, p. 1322-1323, 1996.
- 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.



- CHAO, C. Y. Autonomos development of embryo in *Paspalum conjugatum* Berg. **Bot. Notiser**, v. 133, p. 215-222, 1980.
- CHAPMAN, G. P., BUSRI, N. Apomixis in *Pennisetum*: an ultrastructural study. **Int. J. Plant Sci.**, v. 155, p. 492-497, 1994.
- CHASAN, R. Breaching the callose wall. **The Plant Cell**, v. 4, p. 745-746, 1992.
- CHAUDHURY, A. M. Nuclear genes controlling male fertility. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1277-1283, 1993.
- CHAUDHURY, A. M., MING, L., MILLER, C. CRAIG, S. DENNIS, E. S. PEACOCK, W. J. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 4223-4228, 1997.
- 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. 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.
- 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, J. R., COLEMAN, M. A. Embryology and cytogenetics of apomictic triploid *Eupatorium squalidum* DC (Compositae). **Rev. Brasil. Genet.**, v. 11, p. 129-148, 1988.
- CONNOR, H. F.; DAWSON, M. I. Evolution of reproduction in *Lamprothyrsus* (Arundinae: Gramineae) **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v. 80, p. 512-517, 1993.

- CONSOLARO, M. E. L., PAGLIARINI, M. S., CHAVES, L. J. Meiotic behavior, pollen fertility and seed production in Brazilian populations of *Centella asiatica* (L.). **Cytologia**, v. 61, p. 375-381, 1996.
- 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**. New York: The New York Botanical Garden, 1988. 555p.
- CZAPIK, R. Problems of apomictic reproduction in the families Compositae and Rosaceae. **Folia Geobot. Phytotax.** v. 31, p. 381-387, 1996.
- D'CRUZ, R., REDDY, P. S. Inheritance of apomixis in *Dichanthium*. **Indian J. Plant Breeding**, v. 31, p. 451-460, 1971.
- DARLINGTON, C. D. **The evolution of genetic systems**. New York: Basic Books, Inc. 1958. 265p.
- DARLINGTON, C. D., LA COUR, L. F. **The handling of chromosomes**. Darien: Hafner Publishing Co., 1970. 272p.
- DAVIS, G. L. **Systematic Embryology of the Angiosperms**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1966. 528p.
- DAVIS, G. L. Apomixis in the Compositae. **Phytomorphology**, v. 17, p. 270-277, 1967.
- 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., 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.
- DREWS, G. N., LEE, D. CHRISTENSEN, C. A. Genetic Analysis of female gametophyte development and function. **The Plant Cell**, v. 10, p. 5-17, 1998.
- DUJARDIN, M., HANNA, W. W. Transfer of alien chromosome-carrying gene for apomixis to cultivated *Pennisetum*. In: KHUSH, G. S. (ed). **Apomixis: exploiting hybrid vigor in rice**. Manila: International Rice Research Institute, 1994. p. 31-34.



- ERNST, A. **Bastardierung al Ursache der apogamie im pflanzenreich.** Jena: G. Fisher, 1918. 315p.
- 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.
- FRANKEL, R., IZHAR, S., NITSAN, J. Timing of callase activity and cytoplasmic male sterility in *Petunia*. **Biochem. Genet.**, v. 3, p. 451-455, 1969.
- 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.
- GOLDBERG, R. B., BEALS, T. P., SANDERS, P. M. Anther development: basic principles and practical application. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1217-1229, 1993.
- GOLDENBERG, R., SHEPHERD, G. J. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation. **Pl. Syst. Evol.**, v. 211, p. 13-29, 1998.
- GOUNARIS, E. K., SHERWOOD, R. T., GOUNARIS, I., HAMILTON, R. H., GUSTINE, D. L. Inorganic salts modify embryo sac development in sexual and aposporous *Cenchrus ciliaris*. **Sex Plant Reprod.** v. 4, p. 188-192, 1991.
- GRANT, V. **Plant Speciation.** New York: Columbia University Press, 1971. 435p.
- GRIMANELLI, D., LEBLANC, O., ESPINOSA, E., PEROTTI, E., DE LEÓN, D. G., SAVIDAN, Y. Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*. **Heredity**, v. 80, p. 33-39, 1998.
- GROSSNIKLAUS, U., KOLTUNOW, A., CAMPAGNE, M. L. A bright future for apomixis. **Trends Plant Sci.**, v. 3, p. 415-416, 1998.
- 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.* **Lund. Univ. Arsskrift N. F.**, v. 42, p. 1-67, 1946.
- GUSTAFSSON, A. *Apomixis in higher plants. III. Biotype and species formation.* **Lund. Univ. Arsskrift N. F.**, v. 43, p. 183-370, 1947.
- HAIR, J. B. Subsexual reproduction in *Agropyron*. **Heredity**, v. 10, p. 129-160, 1956.
- HAKANSSON, A. Die entwicklung des embryosacks und die befruchtung bei *Poa alpina*. **Hereditas**, v. 29, p. 25-61, 1943.
- HANNA, W. W., BASHAW, 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. **J. Elisha Mitch. Sci. Soc.**, 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.
- HESLOP-HARRISON, J., HESLOP-HARRISON, Y. An analysis of gamete and organelle movement in the pollen tube of *Secale cereale* L.. **Plant Science**, v. 51, p. 203-213, 1987.
- HESLOP-HARRISON, J., HESLOP-HARRISON, Y. Actomyosin and movement in the angiosperm pollen tube: an interpretation of some recent results. **Sex Plant Reprod.**, v. 2, p. 199-207, 1989.
- HESLOP-HARRISON, J., HESLOP-HARRISON, Y. Intracellular motility and the evolution of the actin cytoskeleton during development of the male gametophyte of wheat (*Triticum aestivum* L.) **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.**, v. 352, p. 1985-1993, 1997.
- HIGNIGHT, K. W., BASHAW, E. C., HUSSEY, M. A. Cytological and morphological diversity of native apomictic buffelgrass *Pennisetum ciliare*, (L.) **Link. Bot. Gaz.**, v. 152, p. 214-218, 1991.
- HOISINGTON, D., KHAIRALLAH, M., REEVES, T., RIBAUT, J.-M., SKOVMAND, B., TABA, S. WARBURTON, M. Plant genetic resources: what can they



- contribute toward increased crop productivity? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 5937-5943, 1999.
- HOLMGREN, I. Zytologische studien uber die fortpflanzung bei den gattungen *Erigeron* und *Eupatorium*. **K. Sven Vetenskapsakad. Handl.**, v. 59, p. 1-118, 1919.
- HU, G., LIANG, G. H., WASSOM, C. E. Chemical induction of apomictic seed formation in maize. **Euphytica**, v. 56, p. 97-105, 1991.
- 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.
- IZMAILOW, 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.
- JOHANSEN, A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co., 1940. 523p.
- JOHANSEN, A. **Plant embryology, embryogeny of the Spermatophyta**. New York: Chronica Botanica Company, 1950. 305p.
- KAPIL, R. N., BHATNAGAR, A. K. Central cell: pre- and post-fertilization parameters. **Phytomorphology**, v. 33, p. 157-167, 1983.
- KHUSH, G. S., BRAR, D. S., BENNETT, J., VIRMANI, S. S. Apomixis for rice improvement. In: KHUSH, G. S. (ed). **Apomixis: exploiting hybrid vigor in rice**. Manila: International Rice Research Institute, 1994. p. 1-22.
- 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)**. St. Louis: 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. 862-888, 1976.
- KNOX, R. B. Apomixis: seasonal and population differences in a grass. **Science**, v. 157, p. 325-326, 1967.

- 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.
- KOJIMA, A.; NAGATO, Y. Pseudogamous embryogenesis and the degree of parthenogenesis in *Allium tuberosum*. **Sex Plant Reprod.**, v. 5, p. 79-85, 1992.
- KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1425-1437, 1993.
- KOLTUNOW, A. M., BICKNELL, R. A., CHAUDHURY, A. M. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1345-1352, 1995.
- LAKSHMANAN, K. K., AMBEGAOKAR, K. B. Polyembryony. In: JOHRI, B. M. **Embryology of angiosperm**. Berlin: Springer, 1984. p. 446-474.
- LEBLANC, O., PEEL, M. D., CARMAN, J. G., SAVIDAN, Y. Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). **Amer. J. Bot.**, v. 82, p. 57-63, 1995.
- 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.
- LOPES, M. A., LARKINS, B. A. Endosperm origin, development and function. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1383-1399, 1993.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e medicinais**. Nova Odessa: Plantarum Ltda., 1991. 440p.
- LUKINA, L., YUDIN, B. Apomixis in maize x *Tripsacum* hybrids: new cases of autosegregation. **Apomixis Newsletter**, v. 4, p. 12, 1992.
- MAHESHWARI, P. **An introduction to the embriology of angiosperms**. New York: McGraw-Hill Co., 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.
- MASAND, P., KAPIL, R. N. Nutrition of the embryo sac and embryo – a morphological approach. **Phytomorphology**, v. 16, p. 158-175, 1966.



- 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.
- 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. Genetics of apospory in *Ranunculus auricomus*. IV. Embryology of F<sub>3</sub> and F<sub>4</sub> 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, B. M. (ed). **Embryology of Angiosperms**. Berlin: Springer, 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.
- NYGREN, A. Apomictic and sexual reproduction in *Calamagrostis purpurea*. **Hereditas**, v. 35, p. 285-300, 1949.
- NYGREN, A. Apomixis in the angiosperms. **The Botanical Review**, v. 20, p. 577-649, 1954.
- NYGREN, A. Cytological and embryological studies in arctic Poae. **Symb. Bot. Ups.**, v. 10, p. 1-64, 1950.
- OHAD, N., MARGOSSIAN, L. HSU, Y.-C., WILLIAMS, C. REPETTI, P, FISCHER, R. L. A mutation that allows endosperm development without fertilization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 5319-5324, 1996.
- OKABE, S. Parthenogenesis bei *Ixeris dentata*. **Bot. Mag.**, v. 46, p. 518-523, 1932.
- OZIAS-AKINS, P., ROCHE, D. HANNA, W. W. Tight clustering and hemizygoty of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic

- control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 5127-5132, 1998.
- PAMILO, P. Heterozygosity in apomictic organisms. **Hereditas**, v. 107, p. 95-101, 1987.
- PEEL, M. D., CARMAN, J. G., LEBLANC, O. Megasporeocyte callose in apomictic buffelgrass, kentucky bluegrass, *Pennisetum squamulatum* Fresen, *Tripsacum* L., and weeping lovegrass. **Crop Sci.**, v. 37, p. 724-732, 1997.
- 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**. San Francisco: 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.
- PREUSS, D. Chromatin silencing and *Arabidopsis* development: a role for polycomb proteins. **The Plant Cell**, v.11, p. 765-768, 1999.
- 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.
- REISER, L., FISCHER, R. L. The ovule and the embryo sac. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1291-1301, 1993.
- 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**. London: George Allen and Unwin, 1986. 529p.
- RICHARDS, A. J. Why is gametophytic apomixis almost restricted to polyploids? The gametophyte-expressed lethal model. <http://www.cimmyt/biotechnology/apomixis/newsletter/9/ANL9-3.htm>, 1996.
- ROBINSON, H., KING, R. M. Phytogeographical patterns in the tribe Eupatorieae (Asteraceae). **Bol. Soc. Argent. Botan.**, v. 19, p. 45-52, 1980.
- RODKIEWICZ, B. Callose in cell walls during megasporogenesis in Angiosperms. **Planta**, v. 93, p. 39-47, 1970.



- ROZENBLUM, E., MALDONADO, S., WAISMAN, C. E. Apomixis in *Eupatorium tanacetifolium* (Compositae). **Amer. J. Bot.**, v. 75, p. 311-322, 1988.
- RUTISHAUSER, A. Pseudogamie und polymorphie in der gattung *Potentilla*. **Arch. Julius Klaus - Stift Vererbungsforsch.**, v. 23, p. 267-424, 1948.
- RUTISHAUSER, A. Die entwicklungserregung 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. L'apomixie gametophytique chez les graminées et son utilisation en Amélioration des plantes. **Ann. Amélior. Plant**, v. 28, p. 1-9, 1978.
- SAVIDAN, Y. Chromosomal and embryological analysis in sexual x apomictic hybrids of *Panicum maximum* Jacq. **Theor. Appl. Genet.**, v. 57, p. 153-156, 1980.
- SAVIDAN, Y. 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. Evolução em gramíneas tropicais com especial referência a apomixia. **I Colóquio sobre Citogenética e Evolução de Plantas** (Piracicaba), p. 37-50, 1984.
- SAVIDAN, Y. The genetic control of apomixis. **Apomixis Newsletter**, v. 2, p. 24-28, 1990.
- SAVIDAN, Y. New maize x *Tripsacum* hybridizations and the feasibility of apomixis transfer. **Apomixis Newsletter**, v. 4, p. 16-18, 1992.
- SAVIDAN, Y., PERNES, J. Diploid-tetraploid-dihaploid cycles and the evolution of *Panicum maximum* Jacq. **Evolution**, v. 36, p. 596-600, 1982.
- SHELL, 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.
- SCHMIDT, J. M., ANTLEFINGER, A. E. The level of agamospermy in a nebraska population of *Spiranthes cernua* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.**, v. 79, p. 501-517, 1992.

- SKALINSKA, M. Further studies in facultative apomixis of *Hieracium aurantiacum* L.. **Acta Biolog. Cracov.**, v. 16, p. 121-137, 1973.
- 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. Apomixis in *Paspalum secans*. **Am. J. Bot.**, v. 44, p. 318-324, 1957.
- SNYDER, L. A., HERNANDEZ, A. R., WARMKE, H. E. The mechanism of apomixis in *Pennisetum ciliare*. **Bot. Gaz.**, v. 116, p. 209-221, 1955.
- SPARVOLI, E. Osservazioni cito-embriologiche in *Eupatorium riparium*. II. Megasporogenesi e sviluppo del gametofito femminile. **Annali di Botanica**, v. 26, p. 481-504, 1960.
- STEBBINS, G. L. Jr. Cytology of *Antennaria*. II. Parthenogenetic species. **Bot. Gaz.**, v. 94, p. 322-346, 1932.
- STEBBINS, G. L. Jr. Apomixis in the angiosperms. **Bot. Rev.**, v. 7, p. 507-542, 1941.
- STEBBINS, G. L. Jr. **Variation and Evolution in Plants**. New York: Columbia University Press, 1950. 643p.
- STEBBINS, G. L. Jr. **Chromosomal Evolution in Higher Plants**. London: 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.
- STEIGLITZ, H., STERN, H. Regulation of  $\beta$ -1,3 glucanase activity in developing anthers of *Lilium*. **Dev. Biol.**, v. 34, p. 169-173, 1973.
- 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**. Berlin: Springer, 1984. p. 319-376.
- 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.
- WATANABE, K., KING, R. M., YAHARA, T., ITO, M., YOKOYAMA, J., SUZUKI, T., CRAWFORD, D. J.. Chromosomal cytology and evolution in Eupatorieae (Asteraceae). **Ann. Missouri Bot. Gard**, v. 82, p. 581-592. 1995.
- WEBBER, J. M. Polyembryony. **Bot. Rev.**, v. 6, p. 575-598, 1940.
- WHITTEMORE, A. The sectional nomenclature of *Eupatorium* (Asteraceae). **Taxon**, v. 36, p. 618-620, 1987.
- WINKLER, H. Uber parthenogenesis and apogamie in Pflanzenreich. **Prog. Rei. Bot.**, v. 2, p. 293-454, 1908.
- WORRAL, D., HIRD, D. L., HODGE, R., PAUL, W. DRAPER, J. SCOTT, R. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. **The Plant Cell**, v. 4, p. 759-771, 1992.
- 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.

## VIII. APÊNDICE

### *Protocolo dos reagentes e das drogas usadas nas técnicas descritas*

#### **FAA**

500 ml de álcool etílico (95%)

50 ml de ácido acético

115 ml de formaldeído (35%)

335 ml de água destilada

Uso: Na fixação de óvulos para o estudo da megasporogênese

#### **CARNOY**

3 partes de álcool etílico absoluto

1 parte de ácido acético glacial

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

#### **CARMIM ACÉTICO**

50 ml de ácido acético glacial

50 ml de água destilada

1,2 g de carmim

Uso: Na coloração de cromossomos meióticos e mitóticos.

#### **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.

#### **HERR (solução 4½)**

Fenol 1

Cloral hidratado 1

Óleo de cravo 1

Ácido láctico 1

Xilol ½

Uso: Na clarificação de óvulos inteiros.



*MEIO DE HOYER*

200 g de cloral hidratado

50 ml de água destilada

30 g de goma arábica

16 ml de glicerina

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

*AZUL DE ALGODÃO-LACTOFENOL*

500 mg de azul de algodão

100 ml de lactofenol (solução B)

Lactofenol – solução B

20g de fenol cristalizado

20 g de ácido láctico

40 g de glicerina

20 ml de água destilada

Uso: Na coloração de grãos de pólen.



