

## NOTAS CIENTÍFICAS

### Apomixia em *Manihot esculenta* e em seus híbridos interespecíficos<sup>(1)</sup>

Evie dos Santos de Sousa<sup>(2)</sup>

Resumo – O objetivo deste trabalho foi estudar a citogenética e a morfologia do saco embrionário dos clones EB1 (*Manihot esculenta* Crantz) e EB12 (geração F<sub>3</sub> de *M. esculenta* x *M. glaziovii* Muell), dos híbridos F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> de *M. neusana* Nassar x *M. esculenta* e da espécie silvestre *M. neusana*, para verificar o fenômeno da apomixia. Os óvulos foram analisados pelo método de clarificação. Foi verificada apomixia, do tipo apospórica, no clone EB<sub>12</sub>, no híbrido F<sub>2</sub>, e em *M. neusana*. Foi demonstrada a estrutura embriônica da mandioca; foram observados dois sacos embrionários no mesmo óvulo do híbrido F<sub>2</sub>.

Termos para indexação: citogenética, heterozigose, apomixia apospórica.

#### Apomixis in *Manihot esculenta* and in its interespecific hybrids

Abstract – The objective of this work was to study cytogenetic and morphology of the embryonic sac of clones EB1 (*Manihot esculenta* Crantz) and EB12 (F<sub>3</sub> of *M. esculenta* x *M. glaziovii* Muell), of F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> hybrids of *M. neusana* Nassar x *M. esculenta* and of the wild species *M. neusana*, to verify the phenomenon of apomixis. Ovules were observed by the clarification method. Aposporic apomixis was observed in the EB12 clone, in the F<sub>2</sub> hybrid and in *M. neusana*. The embryonic structure of *Manihot* was demonstrated and two embryonic sac were observed in the same ovule of F<sub>2</sub>.

Index terms: cytogenetic, heterozygosity, apospory apomixis.

A apomixia caracteriza-se pela presença de um embrião que não foi formado pela união do núcleo espermático do pólen com a oosfera (Bashaw, 1980). Segundo Asker (1979), a apomixia subdivide-se em embriogenia nuclear e apomixia gametofítica, com base no sítio de origem e no subsequente modelo de desenvolvimento da célula que dará origem ao embrião. No primeiro caso, o embrião forma-se diretamente da célula somática do óvulo, ou dos integumentos ou da parede do óvulo sem a intervenção do saco embrionário ou da célula-ovo. No segundo caso, há formação de sacos embrionários não reduzidos cujas células-ovo se desenvolvem partenogeneticamente em embriões.

A aposporia é um tipo de apomixia gametofítica na qual o saco embrionário

---

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 24 de outubro de 2000.

<sup>(2)</sup> Universidade de Brasília (UnB), Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia, CEP 70919-970 Brasília, DF. E-mail: castroad@hotmail.com

tem núcleo diplóide, pois se origina geralmente de uma ou mais células nucleares (somáticas) que se alargam tornando-se vacuoladas (Asker, 1980). A aparência meristemática destas células contrasta acentuadamente com a das células vizinhas, as quais permanecem inativas ou senescentes.

A aposporia é comumente encontrada em plantas superiores, sendo o grau de diferenciação dos sacos apospóricos inerente a cada espécie. Em algumas espécies, como *Pennisetum ciliare*, é comum a presença de múltiplos sacos por óvulo (Snyder et al., 1955). Pode ocorrer a formação de um saco bem diferenciado juntamente com sacos menos desenvolvidos, e, também, em espécies caracteristicamente apospóricas, um único saco embrionário que pode ou não ser sexual. Neste caso, a localização no óvulo identificará o saco apospórico, uma vez que o saco sexual aparece centralmente na região micropilar (Asker, 1980).

A apomixia em espécies cultivadas pode ser induzida por meio de cruzamentos entre indivíduos de espécies apomíticas aparentadas, com posterior seleção do carácter por meio de cruzamentos entre linhas com elevadas frequências de sacos não-reduzidos (Asker, 1980). No entanto, a melhor possibilidade é por meio de hibridizações entre espécies silvestres aparentadas (Bashaw, 1980). Em *Manihot*, acredita-se que as espécies silvestres sejam fontes de apomixia (Nassar, 1994).

A apomixia no gênero *Manihot* foi descrita pela primeira vez por Nassar, enquanto trabalhava com hibridizações interespecíficas (Nassar, 1980). Posteriormente, o Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura (IICA) mencionou a ocorrência do fenômeno em espécies silvestres de mandioca em 1988. Pela observação de características morfológicas uniformes na progênie de cruzamentos interespecíficos e uso de genes marcadores, foram isoladas linhas apomíticas facultativas, e proposto o uso de espécies silvestres como fontes de genes responsáveis pelo fenômeno (Nassar, 1994).

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de apomixia, por meio de estudos citogenéticos e morfológicos no saco embrionário dos clones EB1 (*Manihot esculenta* Crantz) e EB12 (geração F<sub>3</sub> de *M. esculenta* x *M. glaziovii* Muell), dos híbridos F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> de *M. neusana* Nassar x *M. esculenta* e da espécie silvestre *M. neusana*.

Os genótipos estudados foram provenientes da coleção de campo de mandioca, na Estação Experimental Biológica da Universidade de Brasília. O híbrido F<sub>2</sub> de *M. neusana* Nassar x *M. esculenta* foi obtido do retrocruzamento do híbrido da geração F<sub>1</sub> do cruzamento entre *M. neusana* x *M. esculenta* com *M. esculenta*, sendo representado por *M. neusana* x mandioca x mandioca. As características morfológicas das plantas descritas por Nassar (1985) encontram-se na Tabela 1.

Para o exame do saco embrionário, foram coletados botões florais femininos na fase da antese, fixados e conservados segundo Swaminathan et al. (1954). Os óvulos foram retirados dos ovários por meio de dissecação destes com estiletos sob lupa de aumento, e depois, desidratados numa série de etanol (70, 80, 90 e 100%), durante uma hora, em cada uma das soluções. Posteriormente, foram secados com papel absorvente e colocados numa solução de benzil benzoato quatro e meio (BB 4 ½) para clarificação dos tecidos,

**Tabela 1.** Características morfológicas dos clones EB1 (*Manihot esculenta*) e EB12 (geração F<sub>3</sub> de *M. esculenta* x *M. glaziovii*), de *M. neusana* e dos híbridos de *M. neusana* com *M. esculenta* de primeira e segunda gerações.

Genótipo	Porte	Altura	Caule	Bráctea	Estípula	Pistilo da flor	Flor masculina	Fruto
Clone EB1	Arbusto	1,40 m	Liso marrom	Rudimentar (<5 mm)	Grande (5 x 2 cm)	Cônica (5 x 8 mm); disco amarelo	Ovóide (5 x 6 mm)	Globoso com asa, sem variação cor uniforme
Clone EB12	Arbusto	1,60 m	Liso, com cicatrizes moderadas marrom	Rudimentar (<5 mm)	Rudimentar (<3 cm)	Cônica (5 x 6 mm); disco amarelo	Cônica (10 x 15 mm)	Globoso, sem asa, verdes
<i>M. neusana</i>	Arbusto	2-3 m	Piloso roxo	Semifoliáceas; vermelhas 15 x 4 mm	Rudimentar (<3 cm)	Cônica (5 x 14 mm); disco vermelho	Cônica (10 x 15 mm)	Ovóide, sem asa, cor verde-branca variegada
F <sub>1</sub> de <i>M. neusana</i> x mandioca	Arbustivo	2,60 m	Piloso roxo	Setáceas (7 x 2 mm)	Rudimentar (<3 cm)	Cônica (5 x 10 mm); disco vermelho	Cônica (8 x 12 mm)	Globoso, com asa, cor verde-branca variegada
<i>M. neusana</i> x mandioca x mandioca	Arbusto baixo	90 cm	Piloso roxo	Semi-foliáceas; verde-avermelhadas (11 x 4 mm)	Rudimentar (<3 cm)	Cônica (4 x 9 mm); disco vermelho	Cônica (7 x 11 mm)	Globoso, com asa, cor verde-branca variegada

conforme Herr Junior (1971). Os óvulos clarificados foram então transferidos para uma solução de metil salicilato (100%) e BB 4 ½ (1:1, v/v) conforme Ogburia & Adachi (1995b).

A lâmina foi preparada transferindo-se os óvulos para uma gota da solução clarificante e a lamínula foi colocada delicadamente sobre os óvulos sem esmagá-los. O conjunto foi visualizado em microscópio Olympus BX-50 equipado com lentes oculares DIC (Normanski's differential interference contrast) com filtros apropriados. As imagens foram capturadas pelo sistema de vídeo Sony, modelo DXC-151AP, acoplado ao microscópio e enviadas para o computador dotado de placa de vídeo Matrix Vision, capaz de decodificar o sinal enviado pela câmera fotográfica. As imagens também foram fotografadas pela câmera PM 20 acoplada ao microscópio. Foram visualizados 1.589 óvulos no total dos cinco genótipos estudados.

Para a análise da viabilidade de pólen, foram coletados botões florais dos genótipos estudados durante o estágio de máxima maturação, porém um pouco antes da antese, e depois, fixados e conservados conforme Swaminathan et al. (1954). As anteras foram retiradas e levemente maceradas sobre uma lâmina, e a este material macerado foi adicionada uma gota da mistura à base de carmina, iodo e ácido acético, que tingem, com a cor azulada, apenas os grãos de pólen viáveis. O material foi observado ao microscópio ótico Olympus BX 40, tendo sido contado como grão viável aquele de tamanho grande ou médio, geralmente igual ou acima de 1 mm de diâmetro, completamente colorido e de formato regular esférico.

Para analisar o comportamento meiótico dos cromossomos na metáfase I, os botões masculinos do clone EB12 foram fixados e conservados segundo Swaminathan et al. (1954). As anteras foram esmagadas em uma gota de acetocarmina a 1%. Os excessos de tecido e corante foram removidos, e em seguida foram colocadas as lamínulas. Para fazer lâminas semipermanentes, foi adicionada uma gota da mistura 10:1 de ácido acético 45% e 10% de glicerina, conforme Dane & Tsuchiya (1979). As lâminas foram ligeiramente aquecidas e visualizadas em microscópio Olympus BX-50. Foram visualizadas 50 células em metáfase I da meiose, e escolhidas as 10 melhores para a contagem cromossômica.

A presença de sacos embrionários atrofiados foi a anormalidade mais freqüentemente encontrada; a espécie *M. neusana* mostrou a maior porcentagem (4,68%) (Tabela 2). Esses resultados corroboram os encontrados por Ogburia & Adachi (1995a) em mandioca, em 4% dos óvulos analisados.

**Tabela 2.** Óvulos analisados e anormalidades encontradas nos sacos embrionários dos clones EB1 (*Manihot esculenta*) e EB12 (geração F<sub>3</sub> de *M. esculenta* x *M. glaziovii*), de *M. neusana* e dos híbridos de *M. neusana* com *M. esculenta* de primeira e segunda gerações.

Genótipos	Óvulos analisados	Sacos atrofiados		Sacos apospóricos	
		(N <sup>o</sup> )	(%)	(N <sup>o</sup> )	(%)
<i>M. neusana</i>	256	12	4,68	1	0,39
F <sub>1</sub> de <i>M. neusana</i> x <i>M. esculenta</i>	448	14	3,12	0	0,00
<i>M. neusana</i> x mandioca x mandioca	488	15	3,07	2	0,40
Clone EB 1	257	9	3,50	0	0,00
Clone EB 12	140	1	0,71	2	1,40

A atrofia dos sacos embrionários pode ser interpretada como consequência da propagação vegetativa da mandioca, que não permitiu a ação da seleção sobre a apomixia (Nassar, 1978). Um progenitor que possua esta característica irá mantê-la durante as sucessivas gerações, porque mesmo sendo um caráter relacionado com a esterilidade, seu efeito será minimizado, uma vez que a propagação é assexual.

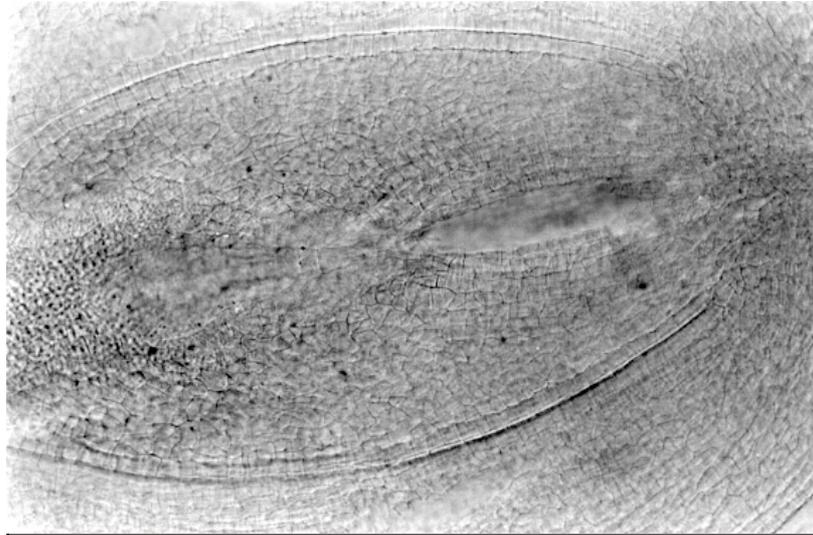
A apomixia foi verificada em *M. neusana*; no híbrido F<sub>2</sub> de *M. neusana* x *M. esculenta* e no clone EB12. Caso semelhante a esse foi relatado em *Cenchrus ciliaris* (Young et al., 1979) e *Pennisetum squamulatum* (Chapman & Busri, 1994). Foi demonstrada a estrutura embrionária da mandioca em óvulos do clone EB1 e verificada a presença de oito núcleos que representaram duas sinérgides, uma oosfera, dois núcleos polares e três antípodas no saco embrionário. Os resultados demonstram que o tipo de apomixia da mandioca é apospórica.

Pela primeira vez, em mandioca, foram observados dois sacos embrionários, um apospórico – provavelmente originado do tecido nucelar –, na região da calaza, e outro, sexual, na região da micrópila, ambos na mesma fase de amadurecimento, e distintamente separados no óvulo do híbrido F<sub>2</sub> de *M. neusana* x *M. esculenta* (Figura 1). A apomixia em mandioca é facultativa, ou seja, a mesma planta pode produzir embriões sexuais e apomíticos (Bashaw, 1980), e o mecanismo responsável é gametofítico, com formação de sacos embrionários apospóricos. De acordo com os resultados, a porcentagem de apomixia no híbrido F<sub>2</sub> de *M. neusana* x *M. esculenta* confirma a transferência desse caráter para outra geração, mesmo em baixas porcentagens. Isso indica que *M. neusana* e o clone EB12 podem ser usados como fontes de genes de apomixia.

Foram analisados, no total, 8.772 grãos de pólen dos genótipos avaliados. Os resultados encontrados sobre a viabilidade de pólen do germoplasma estudado encontram-se na Tabela 3. Do genótipo avaliado, o clone EB12 apresentou a menor viabilidade de pólen (4,62%). Os híbridos F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> de *M. neusana* x *M. esculenta* também apresentaram baixa viabilidade do pólen e, conseqüentemente, baixa fertilidade masculina, uma vez que a viabilidade do pólen representa uma medida satisfatória de fertilidade (Owuor & Vossen, 1981).

Dos 10 esporócitos examinados na metáfase I da meiose no clone EB12, o número médio de bivalentes e univalentes, por célula, foi de 17,8 e de 1,0, respectivamente, totalizando um número cromossômico somático (2n) igual a 37 cromossomos. Foi observada alta freqüência de univalentes e bivalentes.

A formação de bivalentes é freqüentemente usada para indicar o grau de parentesco entre as espécies hibridizadas, e reflete a probabilidade de transferência de genes entre elas. A falta de pareamento entre alguns cromossomos, resultando na formação univalente, demonstra certo distanciamento entre *M. esculenta* e *M. glaziovii*. O pareamento completo, a homologia dos cromossomos e a formação de quiasmas servem para manter os dois cromossomos em um bivalente. Isto foi confirmado pelo estudo de híbridos interespecíficos em diversas culturas; por exemplo, hibridação de *Carthamus linchorius* com *C. alexandrinus* (Estilai, 1977) e em *Cucumis* spp. (Dane & Tsuchiya, 1979).



**Figura 1.** Óvulo apomítico do híbrido  $F_2$  de *Manihot neusana* x *Manihot esculenta* mostrando o saco embrionário sexual à direita e o saco apospórico à esquerda.

**Tabela 3.** Números de grãos de pólen examinados, viáveis, inviáveis e viabilidade dos grãos de pólen (%) dos clones EB1 (*Manihot esculenta*) e EB12 (geração  $F_3$  de *M. esculenta* x *M. glaziovii*), de *M. neusana* e dos híbridos de *M. neusana* com *M. esculenta* de primeira e segunda gerações.

Genótipos	Examinados	Viáveis	Inviáveis	Viabilidade
Clone EB 1	1.250	1.206	44	96,48
Clone EB 12	1.795	83	1.712	4,62
<i>M. neusana</i>	2.100	1.722	378	82,00
$F_1$ de <i>M. neusana</i> x <i>M. esculenta</i>	1.407	392	1.015	27,86
<i>M. neusana</i> x mandioca x mandioca	2.220	580	1.640	26,12

O papel da aneuploidia no desenvolvimento da apomixia pode ser explicado pela hipótese de que o fenômeno seja controlado quantitativamente por mais de um par de genes (Brown & Emery, 1958). A hibridização interespecífica permite a transferência destes alelos ao híbrido. Na segunda e seguintes gerações, a segregação cromossômica é irregular no híbrido, por causa da falta de pareamento, levando à formação de gametas com  $n+1$  ou  $n+2$  cromossomos. A fertilização destes gametas com gametas normais ( $n$  cromossomos) permite a formação de zigotos  $2n+1$ , e  $2n+2$  cromossomos, que podem carregar os alelos complementares necessários para expressar apomixia. Nassar et al. (1997) confirmaram o número cromossômico  $2n+2$  no híbrido  $F_3$  de *M. neusana* x *M. esculenta*. A planta EB12 com  $2n+1$  cromossomos corroborou estes resultados neste trabalho.

### Referências

ASKER, S. Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation. *Hereditas*, Lund, v. 93, n. 2, p. 277-293, 1980.

- ASKER, S. Progress in apomixis research. **Hereditas**, Lund, v. 91, n. 2, p. 231-240, 1979.
- BASHAW, E. C. Apomixis and its application in crop improvement. In: FEHR, W. R.; HADLEY, H. H. (Ed.). **Hybridization of crop plants**. Madison : American Society of Agronomy/Crop Science Society of America, 1980. p. 45-63.
- BROWN, W. V.; EMERY, W. H. P. Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 45, p. 253-263, 1958.
- CHAPMAN, G. P.; BUSRI, N. Apomixis in *Pennisetum*: an ultrastructural study. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 155, p. 492-497, 1994.
- DANE, F.; TSUCHIYA, T. Meiotic chromosome and pollen morphological studies of polyploid *Cucumis* species. **Euphytica**, Dordrecht, v. 28, n. 2, p. 563-567, 1979.
- ESTILAI, A. Interspecific hybrids between *Carthamus tinctorius* and *C. alexandrinus*. **Crop Science**, Madison, v. 17, n. 5, p. 800-802, 1977.
- HERR JUNIOR, J. M. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 58, n. 8, p. 785-790, 1971.
- NASSAR, N. M. A. Attempts to hybridize wild *Manihot* species with cassava. **Economic Botany**, Bronx, v. 34, n. 1, p. 13-15, 1980.
- NASSAR, N. M. A. *Manihot neusana* Nassar: a new species native to Paraná, Brazil. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 65, p. 1097-1100, 1985.
- NASSAR, N. M. A. Selection and development of apomitic cassava clones. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 48, p. 168-170, 1994.1,7
- NASSAR, N. M. A. Wild *Manihot* species of central Brazil for cassava breeding. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 58, p. 257-261, 1978.
- NASSAR, H. N.; NASSAR, N. M. A.; VIEIRA, C.; SARAIVA, L. S. Cytogenetic behaviour of the interspecific hybrid of *Manihot neusana* Nassar and cassava, *M. esculenta* Crantz, and its backcross progeny. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 75, p. 675-678, 1997.
- OGBURIA, M. N.; ADACHI, T. Embryo sac morphostructural analysis of developmental pathways of fertilization failure, seed abortion and poor germination in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Cytologia**, Tokyo, v. 60, n. 1, p. 75-84, 1995a.
- OGBURIA, M. N.; ADACHI, T. An improved cleared-pistil technique for rapid in toto observation of embryo sac malformation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING ON CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 2., 1994, Bogor. **Proceedings...** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1995b. p. 117-127.
- OWUOR, J. B. O.; VOSSEN, H. A. M. van der. Interspecific hybridization between *Coffea arabica* L. and tetraploid and *C. canephora* P. ex Fr. L., fertility in F<sub>1</sub> hybrids and backcrosses to *C. arabica*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 30, n. 3, p. 861-866, 1981.
- SNYDER, L. A.; HERNANDEZ, A. R.; WARMKE, H. E. The mechanism of apomixis in *Pennisetum ciliare*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 116, n. 3, p. 221-299, 1955.
- SWAMINATHAN, N. S.; MAGOON, M. L.; MEARA, K. L. A. Simple propionacarmine PMC smear method for plants with small chromosomes. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, Calcutta, v. 14, p. 87-88, 1954.
- YOUNG, B. A.; SHERWOOD, R. T.; BASHAW, E. C. Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 57, p. 1672-1688, 1979.