



**Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Botânica**

**Estudo Comparativo entre Híbridos Diploides e Tetraploides de
Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz):
Citogenética, Apomixia e Anatomia Caulinar**

**Danielle Yasmin Conceição Hashimoto
Orientador: Prof. Dr. Nagib Mohammed Abdalla Nassar**

Brasília, 2009.

Danielle Yasmin Conceição Hashimoto

**Estudo Comparativo entre Híbridos Diploides e Tetraploides de
Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz):
Citogenética, Apomixia e Anatomia Caulinar**

Dissertação submetida à Universidade de
Brasília como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Nagib Mohammed Abdalla Nassar

Brasília

2009

TERMO DE APROVAÇÃO

Danielle Yasmin Conceição Hashimoto

Estudo Comparativo entre Híbridos Diploides e Tetraploides de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): Citogenética, Apomixia e Anatomia Caulinar

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em Botânica pelo Programa de Pós Graduação em Botânica, Universidade de Brasília, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:

Prof. Dr. Nagib Mohammed Abdalla Nassar
Departamento de Genética e Morfologia, UnB

Profa. Dra. Sueli Maria Gomes
Departamento de Botânica, UnB

Profa. Dra. Silviene Fabiana Oliveira
Departamento de Genética e Morfologia, UnB

Prof. Dr. Augusto César Franco
Departamento de Botânica, UnB

Brasília, fevereiro de 2009.

DEDICATÓRIA

A Deus
Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida, e a todos que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial à minha família, amigos e meu futuro esposo, pelo total apoio, motivação e paciência, em especial ao meu pai, Hugo, em quem me espelho e a quem sempre buscarei imitar.

Ao querido professor Nagib Nassar, pelos ensinamentos que ultrapassaram essas páginas impressas.

À professora Dalva Graciano Ribeiro, pela orientação essencial em anatomia, agradeço pela disponibilidade, dedicação, disposição, sempre com uma simpatia inigualável.

Aos alunos e colaboradores do Laboratório de Melhoramento da Mandioca, meus agradecimentos, em especial à Paula Fernandes Gomes, Juliana Osse de Sousa e Lauana Costa Nogueira, pelo auxílio técnico laboratorial.

Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
MATERIAL E MÉTODOS	18
ANÁLISE CITOGENÉTICA	18
COMPORTAMENTO CROMOSSÔMICO MEIÓTICO	18
VIABILIDADE DE PÓLEN	19
ANÁLISE ANATÔMICA DO ÓVULO	19
ANÁLISE ANATÔMICA DO CAULE	20
RESULTADOS	23
DESCRIÇÕES MORFOLÓGICAS	23
ANÁLISE CITOGENÉTICA	25
COMPORTAMENTO CROMOSSÔMICO MEIÓTICO	25
VIABILIDADE DE PÓLEN	25
ANÁLISE ANATÔMICA DO ÓVULO	26
ANÁLISE ANATÔMICA DO CAULE	27
DISCUSSÃO	33
ANÁLISE CITOGENÉTICA	33
COMPORTAMENTO CROMOSSÔMICO MEIÓTICO	33
VIABILIDADE DE PÓLEN	35
ANÁLISE ANATÔMICA DO ÓVULO	37
ANÁLISE ANATÔMICA DO CAULE	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

- Figura 1** – Aspectos morfológicos dos parentais *M. esculenta* e *M. oligantha* ...8
- Figura 2** – Inflorescência, pólen e algumas etapas relacionadas ao tratamento das amostras.....22
- Figura 3** – Aspectos morfológicos dos híbridos diploide e tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha* I62
- Figura 4** – Aspectos morfológicos dos híbridos diploide e tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha* II.....63
- Figura 5** – Configuração cromossômica e Grãos de pólen, tétrades e micronúcleos observados nos híbridos diploide e tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*.....64
- Figura 6** – Aspectos anatômicos de óvulos apomíticos e não apomíticos nos híbridos entre *M. esculenta* x *M. oligantha*.....65
- Figura 7** – Cortes transversais do caule dos híbridos diploide e tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha* I.....66
- Figura 8** – Cortes transversais do caule dos híbridos diploide e tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha* II.....67
- Figura 9** – Cortes longitudinais do caule dos híbridos entre *M. esculenta* x *M. oligantha* com visualização de floema e laticíferos.....68
- Figura 10** – Cortes transversais do caule dos híbridos entre *M. esculenta* x *M. oligantha* com visualização do floema interno.....69
- Figura 11** – Cortes transversais e elementos de vaso nos híbridos entre *M. esculenta* x *M. oligantha*70

Figura 12 – Testes histoquímicos em secções transversais caulinares nos híbridos entre <i>M. esculenta</i> x <i>M. oligantha</i> - controle.....	71
Figura 13 – Testes histoquímicos com lugol para detecção de amido em cortes transversais caulinares nos híbridos entre <i>M. esculenta</i> x <i>M. oligantha</i>	72
Figura 14 – Testes histoquímicos com cloreto de zinco iodado para detecção de lignina em cortes transversais caulinares nos híbridos entre <i>M. esculenta</i> x <i>M. oligantha</i>	73
Figura 15 – Testes histoquímicos com Sudan III e Sudan IV para detecção de suberina e látex em cortes transversais caulinares nos híbridos entre <i>M. esculenta</i> x <i>M. oligantha</i>	74

Tabelas

Tabela 1 – Viabilidade do pólen dos híbridos diploide e tetraploide entre <i>M. esculenta</i> x <i>M. oligantha</i>	25
Tabela 2 – Quantidade de óvulos observados e porcentagem de apomixia nos híbridos diploide e tetraploide entre <i>M. esculenta</i> x <i>M. oligantha</i> ...	27
Tabela 3 – Principais características anatômicas caulinares dos híbridos diploide e tetraploide entre <i>M. esculenta</i> x <i>M. oligantha</i>	30
Tabela 4 – Elementos de vaso dos diploide e tetraploide entre <i>M. esculenta</i> x <i>M. oligantha</i> classificados por tamanho	32

Gráfico

Gráfico 1 – Quantidade de esporocitos normais e anormais contados nos híbridos diploide e tetraploide entre <i>M. esculenta</i> x <i>M. oligantha</i> ...	26
--	----

**Estudo Comparativo entre Híbridos Diploides e Tetraploides de
Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz):
Citogenética, Apomixia e Anatomia Caulinar**
(Hashimoto, D. Y. C.; Mestrado em Botânica)

RESUMO: Os híbridos interespecíficos diploide e tetraploide entre *Manihot esculenta* Crantz e *M. oligantha* Pax foram analisados em nível citogenético, anatômico embrionário e anatômico caulinar com o objetivo de se verificar os efeitos do tratamento de poliploidização. A análise citogenética foi realizada para determinar o número cromossômico de esporocitos em metáfase meiótica. No híbrido diploide, o número cromossômico encontrado foi 36, e no híbrido poliploidizado foi 72. Através de análises dos grãos de pólen, verificou-se que a média de viabilidade no híbrido diploide foi de 83,5%, enquanto que, para o tetraploide, a viabilidade do pólen foi de 64,8%. O estudo do esporocito também revelou 99,6% de tétrades normais para o híbrido diploide e 19,2% para o tetraploide, evidenciando efeitos de anormalidade meiótica produzidos possivelmente pelo tratamento de poliploidização. A taxa de apomixia saltou de 2,7% no tipo diploide para 18% no tetraploide, evidenciando uma possível associação da duplicação cromossômica com o aumento na ocorrência de apomixia. Na anatomia caulinar, os híbridos diploide e tetraploide mostraram muitas semelhanças, entretanto, em termos quantitativos, a planta poliploidizada revelou tecido medular mais desenvolvido e maior número de elementos de vasos, além de diâmetro caulinar aumentado. A análise de dissociados do caule mostrou que os elementos de vaso para os dois híbridos foram predominantemente do tipo reticulado, com placa de perfuração simples e extremidades oblíquas. Os laticíferos foram do tipo articulado e ramificado, e puderam ser vistos em ambos os híbridos. Os testes histoquímicos mostraram diferentes locais de acúmulo de amido e lignina no caule dos híbridos e presença de látex no floema interno de ambos. O aumento nas dimensões de estruturas e órgãos, em termos de número de camadas e tamanho celular, assim como o aumento observado no tecido vascular foram alterações induzidas pela poliploidia e podem estar relacionadas ao grau de tolerância da planta à seca.

Palavras-chave: anatomia caulinar, apomixia, Euphorbiaceae, *Manihot esculenta* Crantz, poliploidia.

**Comparative Study between Cassava (*Manihot esculenta*
Crantz) Diploid and Tetraploid Hybrids:
Citogenetics, Apomixis and Stem Anatomy**
(Hashimoto, D. Y. C.; Botanical Master of Science)

ABSTRACT: The interspecific diploid and tetraploid hybrids between *Manihot esculenta* Crantz and *M. oligantha* Pax were analyzed in cytogenetic, embryonic and stem anatomy aspects, in order to verify the effects of the polyploidization treatment. Cytogenetic analysis were made to determine the chromosome number in sporocytes in metaphase meiotic. The diploid and the tetraploid hybrids showed 36 and 72 chromosomes, respectively. Pollen viability indicated an average of the diploid hybrid of 83.5%, and another of 64.8% related to the tetraploid. Normal tetrads were found in the diploid (99.6%), while the tetraploid one had just 19.2% of them; this fact can be related to the abnormal meiotic effects developed by polyploidization. Apomixis rates varied from 2.7% in the diploid hybrid to 18% in the tetraploid one, pointing out that chromosome duplication may be related to increases in apomixis rates. Stem anatomy showed many resemblances in diploid and tetraploid hybrids, however, in quantitative features, the polyploidized hybrid had medullar tissue more developed, besides a bigger number of vessel elements and greater stem diameter. Stem dissociated were mostly of the reticulate type, with simple perforation plates and oblique extremities. Laticifers were articulated and branched, and were seen in both hybrids. Histochemical tests revealed different places of accumulation of starch and lignin, besides occurrence of internal phloem and latex inside it in both hybrids. Increase in structures and organs size, number of layers and cell size, and the observed increase in vascular tissues were alterations induced by polyploidization and may be related to drought resistance.

Key words: apomixis, Euphorbiaceae, *Manihot esculenta* Crantz, polyploidy, stem anatomy.

INTRODUÇÃO

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, pertence a *Manihot* (Euphorbiaceae), gênero que comporta cerca de 98 espécies, sendo a maioria delas nativa do Brasil (Rogers & Appan, 1973). Segundo Nassar (1978b, 1978f), no Brasil, os principais centros de diversidade de *Manihot* seriam o Nordeste, Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais.

A mandioca é uma das culturas mais importantes na alimentação brasileira. Assume uma posição de destaque na conjuntura sócio-econômica do país e do mundo. O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores mundiais de mandioca, com rendimento médio de 14 t/ha e produção de 26,6 milhões de toneladas (IBGE, 2008).

A cultura possui posição de destaque no país, ocupando a quinta colocação em área de plantio, atrás das culturas de soja, milho, arroz e feijão (IBGE, 2008). Há mais de 800 milhões de pessoas que consomem a mandioca nos trópicos e subtropicais, sendo esta a quinta cultura alimentícia mais consumida em todo o mundo (FAO, 2006).

M. esculenta destaca-se pela sua ampla capacidade de adaptação às condições edafoclimáticas, sua tolerância à competição com ervas daninhas e sua relativa resistência a pragas e doenças (Nassar & Ortiz, 2007). Vantagens como alta produtividade calórica (Vries *et al.*, 1967), eficiência biológica como produtora de energia (Coursey & Haynes, 1970; Raji *et al.*, 2007), disponibilidade durante o ano inteiro (Nassar, 1978a, 1978c e 1978d) e capacidade de crescer em condições subótimas, tornaram a mandioca uma das culturas de subsistência mais utilizadas pelas populações de baixa renda (FAO, 2006).

A grande variabilidade e o amplo espectro de adaptação encontrados em espécies silvestres de diversas culturas (Harlan, 1976; Hajjar & Hodgkin, 2007), inclusive de mandioca, oferecem muitas possibilidades de aproveitamento de seus genes em hibridização interespecífica para o desenvolvimento de tipos mais produtivos, resistentes às pragas e doenças e mais tolerantes às condições de estresse (Horsfall & Abia, 2003; Nassar, 2007a

e 2007b) Entretanto, os cultivares de mandioca mostram-se deficientes em algumas características de valor econômico (Nassar, 1978c e 1979b), como a baixa resistência à seca e o baixo conteúdo proteico (Nassar & Dorea, 1982; Nassar & Grattapaglia, 1986). As características que faltam na mandioca podem ser transferidas à planta cultivada através da hibridização interespecífica com espécies silvestres.

Híbridos interespecíficos obtidos durante os últimos anos (Nassar, 1978-2008) são fontes de características interessantes para o melhoramento da cultura; dentre eles, o híbrido entre *M. esculenta* e *M. oligantha* Pax emend. Nassar subsp. Nesteli – denominado ICB 300 – revelou um conteúdo de proteínas de 4%, em comparação com a quantidade de 0,7-2% encontrado na mandioca cultivada (Nassar & Dorea, 1982). ICB 300 mostrou ser rico também em aminoácidos essenciais como metionina, lisina e triptofano (Nassar & Sousa, 2007), além de ser uma rica fonte de luteína, que é um potente antioxidante (Nassar *et al.*, 2007b). Estima-se que ele possui cerca de 10 vezes mais quantidade de luteína que o encontrado na mandioca comum. Por isso, o estudo dos aspectos botânicos deste híbrido pode fornecer conhecimentos e informações importantes para melhoristas de plantas, agrônomos, biólogos e mesmo botânicos que trabalham nesta área.

O desenvolvimento de híbridos interespecíficos depende principalmente de sua fertilidade. O parentesco entre genomas das espécies parentais é o fator limitante da fertilidade do híbrido gerado. Esse parentesco pode ser conhecido através do estudo do pareamento cromossômico. Dessa forma, este estudo de ICB 300 se torna necessário para se obter informações mais detalhadas sobre sua fertilidade.

A poliploidia frequentemente é um recurso usado para aumentar o conteúdo de matéria seca, inclusive de proteínas, vitaminas e minerais (Stebbins, 1985; Dhawan & Lavania, 1996; Udall & Wendel, 2006). Em geral, as plantas poliplóides apresentam número cromossômico duplicado, podendo ter características morfológicas diferenciadas, como aumento no tamanho de várias partes da planta (Swanson *et al.*, 1969). Graner (1935), Abraham (1944), Cruz (1968), Sohmer (1968), Magoon *et al.* (1969), Nassar (1978e) e Nassar *et*

al. (1995) relatam número cromossômico de 36 para *M. esculenta*, reportando também pareamento regular de 18 bivalentes. Evidências obtidas por Nassar (2006) indicam que a poliploidização em *Manihot* atua na indução de apomixia.

A apomixia, que é um fenômeno de produção de semente sem fecundação, tem grandes vantagens para o melhoramento genético. O uso de sementes apomíticas na propagação da mandioca evita a contaminação por patógenos que se acumulam na reprodução por estacas. O referido acúmulo de patógenos torna o clone inútil após alguns anos, causando redução drástica de produtividade (Nassar, 1981; Nassar & Vieira, 1986; Nassar, 1995a; Nassar *et al.*, 1998). A apomixia ainda evita a segregação genética, garantindo a produção de progenias idênticas às plantas mães. Assim, considera-se a apomixia um método natural para a clonagem de plantas através de sementes (Hanna & Bashaw, 1987; Nassar 2000; Nassar *et al.*, 2000). Dessa forma, a propagação de clones via sementes apomíticas evita os graves problemas de contaminação no estabelecimento, desenvolvimento e produção final da cultura.

Nassar (1995b, 2000b, 2001, 2002a, 2002b e 2006), Nassar & Collevatti (2005 e 2006), Nassar & Grattapaglia (1996) e Nassar *et al.* (1997, 1998, 2000 e 2007a) mostraram, em uma série de estudos, o desenvolvimento de clones apomíticos em *Manihot*. A produção de híbridos interespecíficos apomíticos pela transferência de genes da apomixia de espécies silvestres de *Manihot* também foi obtida em alguns desses trabalhos.

O desenvolvimento de clones apomíticos da mandioca foi acompanhado pelo desenvolvimento de linhagens mandioca com fácil germinação de sementes. Isso possibilitou o uso de sementes em sua propagação, em substituição às práticas culturais trabalhosas de propagação por estacas (Nassar & O'Hair, 1985; Lynam, 1994) que, apesar de manterem a heterose, apresentam os referidos problemas de acúmulo e disseminação de doenças.

A apomixia pode beneficiar o melhoramento de plantas por perpetuar os caracteres que se encontram na planta materna, como resistência a pragas e doenças, e incremento substancial em proteína, como no caso do híbrido ICB 300.

Há varias evidências sobre a relação da apomixia com a poliploidia, em especial em híbridos de *Manihot* (Nassar, 2006), em que o principal efeito da duplicação cromossômica é a verificação do aumento da taxa de apomixia. A confirmação da relação entre apomixia e poliploidia pode ser instrumento de grande valor no desenvolvimento de híbridos de certas culturas, principalmente a da mandioca. Ela representa a solução para a infertilidade de híbridos de qualidade, tanto por restauração da fertilidade da planta quanto pelo aproveitamento do vigor híbrido.

A poliploidia pode ter efeitos sobre a anatomia caular, como no poliplóide do cultivar de mandioca UnB 530, que apresenta aumento de órgãos devido ao incremento do número e tamanho de suas células, inclusive do tecido vascular, o que pode estar relacionado à tolerância deste poliplóide à seca (Nassar *et al.*, 2008b).

Há escassos estudos anatômicos sobre *Manihot* (Vannucci, 1985; Nassar *et al.*, 2008b). Apesar de seu valor econômico, menos ainda é encontrado sobre a relação entre anatomia e fisiologia destas plantas (Nassar *et al.*, 2008b). Muito mais escassos são os que sugerem aspectos com objetivos de sustentabilidade, por exemplo, relacionando a estrutura anatômica caular de um poliplóide com a limitação de ataques de pragas, ou de infecções por patógenos ou à resistência à seca.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Rogers & Appan (1973) listaram 98 espécies de *Manihot*, separadas em 19 seções, sendo *M. esculenta* a única cultivada. Nassar (1985) adicionou ainda *M. neusana* Nassar ao gênero. Para a classificação das espécies silvestres por seções, Rogers & Appan (1973) levaram em consideração o hábito de crescimento, de árvores de cerca de 30 m de altura como *M. caerulescens* Pohl, à arbustos e subarbustos, como *M. anomala* Pohl e *M. tripartita* Müll. et Von Arg., e até mesmo semiherbáceas como todas as espécies inseridas na seção *Peruviana*. Além desses critérios, os autores

utilizaram também 23 características foliares como formato da folha, simples e não-lobada (espécies das seções *Brevipetiolatae* e *Peltatae*) ou simples e lobada, com variável número de lóbulos, inserção basal ou inserção peltada do pecíolo na lâmina, e padrão das veias secundárias, sendo camptódroma quando as veias se interconectam, mas não atingem as bordas da lâmina, e craspedódroma quando as veias alcançam as margens da lâmina.

Ainda conforme Rogers & Appan (1973), as espécies foram agrupadas em monóicas e dióicas, sendo as únicas representantes dióicas as espécies inseridas na seção *Stipulares*. As seções foram separadas conforme o tipo de inflorescência em racemos, como as das espécies na seção *Anisophyllae*, ou em panículas, como nas seções *Heterophyllae*, *Carthaginenses* e *Glaziovianae*. O local de origem das espécies determinou a separação das nativas das Américas do Norte e Central, e da América do Sul,

M. oligantha pertence à seção *Stipulares*, em que se encontram espécies parcial ou totalmente acaulescentes, com menos de 25 cm de altura, folhas nascidas em formato de roseta, estípulas persistentes, inflorescência pistilada ou estaminada e nunca ambas numa mesma planta. *M. oligantha* Pax emend. Nassar subsp. Nesteli foi relatada pela primeira vez por Nassar (1978g) como sendo um subarbusto muito pequeno, com cerca de 30 cm de compr., e entrenós distantes menos de 0,8 cm uns dos outros; 3-5 raízes cilíndricas por planta; lâmina com três lóbulos, mas ocorrendo também, com menos freqüência, de 4-5 lóbulos, membranácea a suavemente coriácea.

Este se distingue de *M. oligantha* por ser tipicamente monóica, com inflorescência em panícula e carúncula proeminente. A espécie descrita por Pax (1884, *apud* Rogers & Appan, 1973) possui inflorescência normalmente dióica e carúncula não proeminente.

Pax (1884, *apud* Rogers & Appan, 1973) não se referiu à formação de raízes tuberosas em *M. oligantha*. Entretanto, esta característica pode ter sido incrementada através de hibridizações naturais entre esta e a mandioca cultivada. Anderson (1953), Harlan (1961) e Rick (1976) demonstraram o papel da hibridização natural introgressiva no desenvolvimento de novas espécies em culturas domesticadas.

ICB 300 foi obtido por Nassar (1978g) pela hibridização entre *M. esculenta* e *M. oligantha*, de natureza introgressiva (Nassar, 1978g). Conforme Rogers & Appan (1973), *M. esculenta* e *M. oligantha* são descritas como se segue:

- *M. esculenta* (Figs. 1A e 1B):

Arbusto, ca. 1,7 m. Raízes saem de um ápice radicular, com raízes secundárias delgadas. Caule lenhoso e glabro, cicatrizes de folha e estípula presentes, predominantemente marrom, mas ocorrendo também amarelo ou prata. Folhas simples, lobada. Lóbulos foliares de 5-9, lineares, lanceolados. Estípulas decíduas e pontiagudas. Pecíolos de 5-25 cm de compr., freqüentemente com formato suave de S, preso basalmente à lâmina, glabro. Lâmina verde escura, algumas vezes com venações avermelhadas. Inflorescência em panícula, de 2-5 cm de compr., glabra, brácteas e bractéolas decíduas. Flores monóicas, sendo as femininas basais, abrindo primeiro, e as masculinas apicais, abrindo mais tarde. O perianto é composto por 5 tépalas separadas, verdes e púrpuras; ovário tricarpelar, glabro. Flores estaminadas com um perianto de 5 tépalas unidas até a metade de seu comprimento; estames normalmente em número de 10 em 2 níveis, 5 curtos e 5 longos, os filetes são delgados e glabros, e surgem a partir do disco basal. Fruto esquizocárpico, normalmente alado, mas algumas vezes com a superfície lisa, deiscência septicida e loculicida. Sementes carunculadas, alongadas ou esféricas, pigmentada com manchas marrons ou lisas.

- *M. oligantha* (Figs. 1C e 1D):

Subarbusto muito pequeno, quase acaulescente, de até 20 cm. Entrenós muito curtos, com menos de 0,5 cm. Caule glabro. Folhas surgem como roseta. Estípulas persistentes, foliáceas, de ca. 4-6 cm de compr., glabras, margens pontiagudas. Pecíolos de

ca. 20 cm de compr., glabros, tingidos de púrpura, inserção basal à lâmina. Lâmina membranácea, venação camptódroma, veias glabras. Lóbulos de 7-9, 6 x 1,5 cm, oblongos, base pouco constricta. Inflorescência dióica, todas as partes glabras, bractéolas setáceas. Flores femininas com ca. de 7 cm de compr., 2 flores nascem no ápice de um pedúnculo solitário, tépalas tingidas de púrpura, ovários subglobosos. Flores masculinas em panícula, ca. 15 cm de compr., brácteas e bractéolas setáceas, pedicelos de ca. de 1 cm de compr., botões ovóides-elipsóides, tépalas de ca. 1,2 cm, com considerável coloração púrpura, estames em número de 10, em 2 níveis.



Fig. 1. Aspectos morfológicos das espécies de *Manihot*. **A.** Aspecto geral de *Manihot esculenta*, planta com 1,7 m, estabelecida na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília. **B.** Folhas de *M. esculenta* e, em detalhe, inflorescência. **C.** Habitat de *M. oligantha*. **D.** *M. oligantha* com 15 cm: raiz, caule, folhas e inflorescência.

A hibridização interespecífica tem desempenhado um grande papel no desenvolvimento de variações também em *Manihot* (Rogers & Appan, 1976). Um grande número de espécies silvestres pode ter se desenvolvido como resultado da hibridização entre cultivares e espécies silvestres locais (Harlan, 1961).

A introdução de genes úteis, ocasionando o aumento da variabilidade na cultura da mandioca, assim como em outras culturas, pode ser realizada através de hibridizações interespecíficas com espécies silvestres (Harlan, 1976; Nassar, 1979a, 1989 e 2007a; Nassar *et al.*, 2000; Hajjar & Hodgkin, 2007; Nassar & Ortiz, 2008). Essas espécies têm sido utilizadas como fonte de resistência a insetos, doenças, pragas e nematóides, sendo em muitos casos promotoras de resistência a estresse e da melhoria da produtividade (Harlan, 1976; Horsfall & Abia, 2003; Nassar, 2007ab).

Em mandioca, vários estudos têm sido realizados a fim de se avaliar o potencial das espécies silvestres no seu melhoramento, como as tentativas de hibridização por Lanjow (1939) e Jennings (1959). Storey & Nichols (1938) utilizaram *M. glaziovii* Müller Von Arg, como fonte de resistência a vírus, obtendo um resultado impressionante e salvando a cultura da extinção no leste da África na década de 1940.

Outros exemplos de hibridização de espécies silvestres com *M. esculenta* podem ser verificados, como com *M. tristis* Müller Von Arg., que foi utilizada como possível fonte de proteínas (Bolhuis, 1953); *M. caerulescens*, que foi descoberta como fonte de matéria prima para produção de borracha; *M. pseudoglaziovii* Pax & K. Hoffman e *M. dichotoma* Ule, que são resistentes à seca, dentre outras espécies de *Manihot* com diversas características de valor econômico (Nassar & Ortiz, 2008).

Esforços têm sido feitos há algum tempo na tentativa de se aumentar o conteúdo de proteína nas raízes de mandioca através da hibridização interespecífica, principalmente com as espécies *M. saxicola* Lanj. e *M. melanobasis* Müller Von Arg. Durante um período de 10 anos, de 1932 a 1942, Bolhuis (1953) desenvolveu um programa de melhoramento da mandioca em relação ao aumento de proteína nas raízes. Cruzamentos com *M. saxicola*

produziram poucas plântulas com um máximo de 2% de proteína na raiz fresca. Nos clones propagados dessas plântulas, o conteúdo de proteína voltou aos níveis típicos de 0,7-2%. Jennings (1959) relatou que as raízes da progenia F₁ de *M. esculenta* e *M. melanobasis* possuía aproximadamente duas vezes mais proteína que seu ancestral. Essas progenias se perderam, não sendo cultivadas em lugar algum, provavelmente por causa da baixa produtividade das raízes.

Barros & Bressani (1967) e o CIAT, na década de 1970, apresentaram cultivares com alto conteúdo proteico (7%), entretanto, não se sabe se esse conteúdo se refere realmente à quantidade de proteína ou à de nitrogênio na forma de ácido hidrocianídrico (HCN). Outro fator que interfere na avaliação de proteínas como nitrogênio total é a umidade no material. A secagem excessiva da raiz durante o processamento para análise pode aumentar drasticamente a porcentagem de nitrogênio (Nassar & Sousa, 2007). Dessa forma, é importante avaliar a quantidade de proteína como aminoácidos juntamente à avaliação de nitrogênio na amostra.

Nassar (1979a) relatou alto conteúdo de proteína em *M. oligantha*, transferindo esse conteúdo proteico para a mandioca comum por hibridização interespecífica (Nassar & Dorea, 1982). No mesmo estudo, os autores observaram que o híbrido formado, ICB 300, tem um conteúdo de 4,5% de proteína total na raiz seca. Nassar & Sousa (2007) relataram que, o híbrido possui cerca de 10 vezes mais lisina e três vezes mais metionina que a mandioca comum, além de constatarem a presença de outros aminoácidos essenciais, como histidina e prolina, que passaram de total ausência em *M. esculenta* para 0,038 e 0,054 g/100 g de matéria seca analisada, respectivamente, e arginina, alanina, isoleucina, valina, leucina, dentre outros, com aumento que variou de 2-9 vezes.

Conforme Close *et al.* (1953), a proteína da mandioca processada inclui uma alta porcentagem de ácido glutâmico e baixas taxas de metionina (1%). Sreeramanamubry (1945) relatou a ausência total de metionina na mandioca. Osuntokun *et al.* (1968) afirmaram que tanto a cisteína quanto a cistina estão envolvidas na detoxificação do cianeto.

Nassar *et al.* (2007b) estimaram que ICB 300 possui cerca de 10 vezes mais quantidade de luteína na raiz, que é um potente antioxidante, quando comparado à quantidade aferida em *M. esculenta*. O consumo de luteína parece estar relacionado à redução das doenças degenerativas (Krinsky, 1994). Por isso, o estudo dos aspectos botânicos deste híbrido pode fornecer conhecimentos importantes que podem ajudar sobremaneira no combate a diversas doenças.

Apesar de a hibridização interespecífica promover a transferência de características entre espécies, o híbrido formado pode ser estéril, ou a população híbrida pode não gerar as combinações desejadas devido à incompatibilidade entre as plantas (Briggs & Knowles, 1967; Stebbins, 1985). Essa incompatibilidade pode ser de natureza zigótica ou pós-zigótica (Briggs & Knowles, 1967; Rick, 1976). A primeira se manifesta por meio da inibição da germinação do grão de pólen, da interrupção do desenvolvimento do tubo polínico na superfície do estigma ou no estilete, da reduzida velocidade do tubo polínico em relação ao tempo de viabilidade do óvulo, ou ainda pelo comprimento do tubo polínico que não o permite chegar ao óvulo. A segunda se manifesta por meio do desequilíbrio entre os genótipos parentais.

Para superar tais barreiras, Dobzhansky (1951) e Stebbins (1950, 1985), dentre outros, sugeriram uma série de alternativas como o cruzamento de diferentes variedades das espécies parentais, cruzamentos invertendo-se as espécies doadora e a receptora de pólen, a polinização em diferentes estágios do desenvolvimento, a emasculação e a utilização de técnicas de enxertia. Entretanto, essas alternativas não se aplicam a muitas espécies, e contornar as barreiras da hibridização torna-se um trabalho árduo, e por vezes sem sucesso.

Nassar *et al.* (1996) utilizaram a técnica do efeito mentor para superar barreiras interespecíficas na hibridização entre *M. esculenta* e *M. pohlii* Warwa, obtendo resultados satisfatórios. Nesse mesmo trabalho, métodos de utilização de espécie-ponte também geraram resultados positivos quanto à quebra das barreiras em *Manihot*.

Pesquisadores recorrem também à poliploidização de seus híbridos com o intuito de produzir aumento do conteúdo de matéria seca e de conteúdo

nutritivo (Stebbins, 1985; Dhawan & Lavania, 1996; Udall & Wendel, 2006). Isso se aplica aos aspectos nutricionais como os encontrados em ICB 300, que podem ter seu conteúdo aumentado com a duplicação do nível de ploidia do híbrido.

Muitos mecanismos têm sido utilizados para se induzir poliploidia em plantas (Ramsey & Schemske, 1998), incluindo tratamento de tecidos somáticos como partes vegetativas e sementes. Nem sempre essa indução produz poliploidia total no tecido, mas freqüentemente produz quimeras (Stebbins, 1985).

Nassar (2003 e 2004) demonstrou o efeito da utilização de colchicina na estrutura do caule de um híbrido de mandioca, evidenciando a formação de quimeras. Quimeras são identificáveis na planta através de estudos anatômicos, representando a ação incompleta da colchicina no caule. Essa substância pode atuar somente na camada epidérmica ou nas camadas epidérmica e subepidérmica (Nassar, 2004). Na estrutura da quimera, a epiderme difere dos tecidos internos (Baker, 1959), o que pode ser evidenciado tanto em aspectos morfológicos quanto em número cromossômico.

Apesar da desvantagem de produzir quimeras, quando o objetivo é se produzir poliploidia integral, o tratamento de tecidos somáticos é o método mais usado pelos pesquisadores pela relativa facilidade de aplicação. A indução de poliploidia somática também é muito comum em tecidos não meristemáticos, como o caule (Coleman, 1950; D'amato, 1952 e 1964). A poliploidia também pode surgir espontaneamente na natureza, mesmo com pouca freqüência, devido à formação de gametas não reduzidos (Bretagnole & Thompson, 1995).

A obtenção de ramos poliplóides pode ser realizada com a aplicação de colchicina (Nassar, 1965; Hanna, 1981; Hanna *et al.*, 1984; Hanna & Dujardin, 1986) nas gemas laterais do caule. O mecanismo de atuação da colchicina foi relatado por Jackson (1976), em que, no fim da prófase, há a inibição da formação do fuso. Quando isso acontece em primórdios de botões laterais, todo o caule originado é poliplóide. Se a duplicação cromossômica não atingir todas as camadas do primórdio, podem surgir quimeras setoriais ou periclinais, dependendo do tamanho do tecido atingido pela colchicina (Nassar, 1965).

ICB 300 foi poliploidizado, propagado e mantido na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília, constituindo 55 plantas do tipo diploide e 20 plantas tetraploides. O tratamento para poliploidização foi realizado nas gemas laterais do caule, através de aplicação de colchicina 0,2% embebida em algodão (Nassar, 2004). Os ramos crescidos das gemas tratadas foram retirados, e mudas (estacas) dos mesmos foram feitas.

A indução de poliploidia gerou alterações anatômicas em várias plantas em *Solanum* sp (Baker, 1959) e morfológicas em *Colophospermum* sp (Rubuluzza *et al.*, 2007). Em *Solanum*, a poliploidização do caule resultou em diferenças anatômicas com relação à forma das células (de isodiamétricas a alongadas) e seu tamanho (quanto maior a ploidia maiores as células). Stebbins (1950) relatou que um dos principais efeitos produzidos pela duplicação cromossômica é o aumento no tamanho celular.

Plantas poliploidizadas artificialmente geralmente têm comportamento meiótico mais irregular que plantas diploides, uma vez que o pareamento cromossômico pode formar associações polivalentes, comprometendo a segregação cromossômica em direção aos polos, e produzindo cromossomos retardatários, pontes e fragmentos (do Valle *et al.*, 2004). O resultado, dependendo do grau de irregularidades na divisão celular, é a diminuição da fertilidade até a completa esterilidade do indivíduo. Para Stebbins (1950), as principais causas de esterilidade em autotetraploides são uma série de desarmonias produzidas em vários estágios do ciclo sexual, em que a meiose é a mais importante.

Poucas são as informações disponíveis acerca da anatomia da mandioca e de todo o gênero. Provavelmente, as mais notáveis contribuições são as de Viègas (1940), que produziu uma descrição anatômica de partes vegetativas em *M. utilíssima* Pohl (sinônimo de *M. esculenta*); de Mendonça (1983 e 1992), que observou lâminas foliares de *M. caerulescens* e *M. glaziovii* e de Rudall (1994), que descreveu laticíferos em Crotonoideae, subfamília a qual pertence o gênero.

Em especial, Nassar *et al.* (2008b) estudaram a anatomia de uma cultivar de mandioca, denominada UnB 530, em comparação com seu híbrido

poliploidizado. Aparentemente, o aumento observado nas estruturas da planta tetraploide, em detrimento ao da planta diploide, conferiu ao indivíduo poliploidizado maior resistência à seca, possivelmente por um efeito secundário da poliploidização relacionado ao conteúdo de água na planta. Na maioria das células vegetais maduras o citoplasma é pressionado contra a parede, e a parte central da célula é ocupada pelo vacúolo; a relação de água para o protoplasma depende da razão entre volume e superfície da célula. Assim, qualquer aumento no tamanho celular causa um aumento correspondente na razão volume/área superficial, aumentando o conteúdo de água relativo (Stebbins, 1985).

Kaminski *et al.* (1990) e Pyke *et al.* (1990) relataram efeitos da poliploidia em folhas de *Aegilops* sp. e Sugiyama (2005) em folhas de *Lolium* sp. A conclusão comum é que o aumento de volume do material genético causado pela poliploidização produz um aumento de tamanho na célula e nos órgãos da planta.

Vannucci (1982) encontrou maior espessura da cutícula e do número de células ricas em tanino em folhas de *M. caerulescens*, comparadas à *M. pilosa* Pohl. O estudo anatômico do caule no gênero conta com poucas informações, e ainda, comparações anatômicas entre plantas diploides e poliplóides são raras para *Manihot* (Nassar, 2004).

Acredita-se que, além dos efeitos já citados, a poliploidização tem papel na indução de apomixia em *Manihot* (Nassar, 2006). No fenômeno da apomixia, as sementes se desenvolvem no ovário, como nas plantas de reprodução sexual, mas o embrião é formado sem a união do núcleo espermático do pólen com a oosfera (Bashaw, 1980). Assim, este embrião tem exatamente a mesma constituição da planta mãe e sua progênie é um verdadeiro clone, mantendo sua fidelidade genética durante as sucessivas gerações (Nassar, 1994).

A apomixia é geneticamente controlada, podendo ser influenciada por fatores ambientais, como o fotoperíodo e a temperatura (Stebbins, 1950; Asker, 1980; Bashaw, 1980). A reprodução assexuada por apomixia pode ser obrigatória ou facultativa. A combinação entre reprodução sexual e apomítica

pode ocorrer em vários graus, com cruzamentos tanto intra como interespecíficos (Hanna & Bashaw, 1987).

A apomixia, segundo Asker & Jerling (1979), pode ser subdividida em embrionia nucelar e apomixia gametofítica, com base no sítio de origem da célula que originará o embrião. Nogler (1984) classifica a apomixia em embrionia adventícia, de natureza esporofítica, e apomixia gametofítica. As duas classificações acabam sendo similares, diferindo que na embrionia adventícia os embriões são formados diretamente de células somáticas individuais como as do tegumento interno do óvulo. Na apomixia gametofítica ocorre a formação de embrião com núcleo não-reduzido no próprio saco embrionário.

Na apomixia gametofítica, dois mecanismos podem ser distinguidos, diplosporia e aposporia (Nogler, 1984; Asker & Jerling, 1992). Na diplosporia, o saco embrionário é desenvolvido da célula mãe do megásporo em decorrência de distúrbio na meiose. As divisões meióticas são totalmente omitidas ou tão modificadas que o pareamento e a redução do número de cromossomos não ocorrem. Nesse caso, o saco embrionário se diferencia normalmente e, quando maduro, parece exatamente com o saco embrionário sexual da espécie.

Na aposporia, o embrião não-reduzido é originado de células somáticas do óvulo, geralmente de células do nucelo que são denominadas de “iniciais apospóricas”, ou de células dentro do próprio saco embrionário (Nassar *et al.*, 2000; Nassar, 2001; Carneiro & Dusi, 2004). Na aposporia, eventualmente, junto ao desenvolvimento do saco embrionário apomítico, ocorre o desenvolvimento do saco embrionário meiótico, com possibilidade de ser fecundado e dar origem à progênie através do mecanismo sexual. Entretanto, normalmente antes de o saco embrionário sexual se formar, ocorre aborto, sendo substituído pelo saco apospórico (Bashaw, 1980), entretanto há relatos de que os dois tipos de embriões podem crescer juntos e se desenvolverem em plântulas sexuais e assexuais (Nassar *et al.* 2000; Nassar, 2002a).

A apomixia já foi relatada em mais de 35 famílias de plantas (Hanna & Bashaw, 1987), ocorrendo em *Citrus*, em muitas forrageiras tropicais e subtropicais e em espécies relacionadas à beterraba, morango, manga, milho e

trigo. A apomixia foi noticiada pela primeira vez por Nassar (1979a) enquanto trabalhava com hibridizações interespecíficas. A mandioca é uma espécie apomítica facultativa do tipo apospórica (Nassar, 1994; Nassar *et al.*, 1998; Nassar *et al.* 2000; Nassar, 2001). Em 1988, um relatório do International Institute of Tropical Agriculture (IITA) mencionou apomixia em espécies silvestres da mandioca, não prosseguindo o estudo até a década de 1990, quando Nassar (Nassar, 1995b; Nassar *et al.*, 1997) isolaram linhagens apomíticas facultativas pela observação de características uniformes na progenia de cruzamentos interespecíficos e pelo uso de genes marcadores em cruzamentos controlados.

Nassar (1995b, 2000b, 2001, 2002ab) desenvolveu estudos sobre a natureza da apomixia utilizando-se de hibridizações interespecíficas, e obtendo com sucesso a transferência desse fator à mandioca, a partir das espécies *M. neusana* e *M. glaziovii*. Nassar (2006) coletou evidências sobre a associação entre poliploidia e apomixia estudando *M. anomala* e seus híbridos. Nassar & Collevatti (2005 e 2006) e Nassar & Grattapaglia (1996) relataram trabalhos sobre a base molecular de identificação da apomixia, e Nassar *et al.* (1997, 1998, 2000 e 2007a) observaram evidências moleculares acerca da apomixia em algumas progenias de híbridos interespecíficos de *Manihot*.

Quarin *et al.* (2001) observaram que o aumento de ploidia induziu apomixia em *Paspalum notatum* Flugge. Matzk *et al.* (2003), numa abordagem coevolutiva, estudaram 71 espécies de *Hypericum*, nas quais identificaram que havia um aumento no conteúdo de DNA apomítico concomitantemente com o de ploidia. Hojsgaard *et al.* (2008), em estudos com espécies de *Paspalum*, relataram que todos os representantes poliplóides do gênero se reproduziam por apomixia facultativa.

Swanson *et al.* (1969) relataram que a apomixia ocorre associada à hibridização e poliploidia. Do ponto de vista evolutivo, acredita-se que a apomixia atuaria como um escape da esterilidade, garantindo perpetuação de indivíduos estéreis. Esse mecanismo trazido pela evolução permite que as populações híbridas, pouco ou não férteis, fixem e reproduzam genótipos vantajosos (Richards, 1997). Neste caso, a reprodução assexual via apomixia

seria a responsável pela manutenção de genótipos altamente heterozigóticos das populações híbridas (Nassar, 2001; Goldenberg & Werpachowski, 2004).

Entre certas famílias, como as Melastomastaceae, a esterilidade masculina está relacionada à ocorrência de apomixia (Baumgratz & Silva, 1986; Borges, 1991; Goldenberg & Shepherd, 1998). Entretanto, em alguns casos, indivíduos de espécies apomíticas podem apresentar níveis de viabilidade de pólen relativamente altos (Goldenberg, 2000). Relata-se freqüentemente que a esterilidade em indivíduos apomíticos é causada principalmente pela irregularidade meiótica (Nassar *et al.*, 2000; Nassar, 2000a).

Na mandioca, estudos relataram correlação entre baixa viabilidade de pólen em plantas apomíticas (Amorim, 1998; Nassar *et al.*, 2000; Nassar, 2001; Nassar, 2006). Aparentemente, a natureza apomítica, quando induzida pela poliploidização, parece aumentar a expressão de certos genes especialmente envolvidos com a reprodução (Nassar, 2006).

Desta maneira, o objetivo geral deste trabalho é:

Analisar os efeitos da poliploidização em termos de comportamento embrionico e anatômico caulinar dos híbridos ICB 300.

Os objetivos específicos são:

- Verificar a poliploidização da planta pela contagem cromossômica dos híbridos;
- Aferir a taxa de ocorrência de apomixia, correlacionando-a com o comportamento cromossômico observado;
- Verificar a relação entre poliploidia e fertilidade nos híbridos através da análise de viabilidade do pólen;
- Contribuir para a caracterização da anatomia caulinar de híbridos de *Manihot*.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as análises foram realizadas com o híbrido ICB 300 diploide, obtido do cruzamento entre *Manihot esculenta* e *Manihot oligantha* e seu tipo poliploidizado.

Além das análises citogenética, embriônica e anatômica caulinar, procederam-se também as descrições morfológicas dos híbridos.

O material testemunha foi incorporado ao Herbário da Universidade de Brasília sob os números 75973 (planta diploide) e 75974 (planta tetraploide).

Análise Citogenética

A análise citogenética incluiu o estudo do comportamento cromossômico na meiose e da viabilidade de pólen dos híbridos.

Comportamento Cromossômico Meiótico

Com a finalidade de se estudar o comportamento cromossômico meiótico e analisar o efeito da poliploidização do híbrido, foram observadas as configurações cromossômicas de dez células na metáfase I de cada híbrido.

Botões florais masculinos (Fig. 2A) com cerca de 0,3 cm de diâmetro foram coletados dos híbridos diploide e tetraploide; foi feita a fixação dos mesmos com uma solução de álcool etílico absoluto e ácido acético glacial na proporção 3:1 (líquido de Carnoy). As amostras permaneceram na solução fixadora durante 24 h e foram lavadas com água destilada para retirada de resíduos. A conservação foi feita em etanol 70% sob refrigeração. As lâminas foram preparadas esmagando-se as anteras retiradas dos botões florais, que foram coradas com acetocarmina 1% (Swaminathan *et al.*, 1954). As lâminas foram cobertas com lamínula e lavadas com ácido acético 45%. Foi adicionada uma gota de solução de ácido acético 45% e glicerina 10% (Fenny Dane & Tsuchiya, 1979). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz, modelos Olympus BX 50 e Zeiss Axioskop MC 80. As imagens foram digitalizadas através do software HonestechTVR 2.5 e também fotografadas em película,

com o máquina fotográfica Opton West Germany acoplada ao microscópio MC 80. Os números cromossômicos dos híbridos diploide e tetraploide foram determinados.

Viabilidade de Pólen

Foram coletadas, para cada um dos híbridos e de um conjunto de 55 plantas diploides e 20 plantas tetraploides, 30 flores masculinas com comprimento médio aproximado de 0,7 cm, em máximo grau de maturação e pré-antese (Fig. 2B). A fixação, conservação e coloração foram feitas da mesma forma que na caracterização cromossômica (Swaminathan *et al.*, 1954). Cada flor possuía cerca de dez anteras, as quais foram esmagadas provocando a liberação dos grãos de pólen para a montagem da lâmina. O grão de pólen que se apresentou de forma circular, grande e corado homoganeamente, num tom vermelho intenso, foi considerado viável. O grão irregular, pequeno ou com coloração heterogênea, amarelo-claro, foi considerado inviável (Fig. 2C). A contagem dos grãos de pólen foi feita e a porcentagem de viabilidade da planta foi verificada através da razão entre os grãos viáveis e o total de grãos contados na lâmina. Esporocitos em fase final de divisão foram observados e ocorrências de normalidade (formação de tétrades) e anormalidades (formação de díades, tríades ou tétrades com micronúcleos) foram quantificadas para o estudo da regularidade da formação do grão de pólen.

Análise Anatômica do Óvulo

Cerca de 70 inflorescências femininas (Fig. 2A) de cada híbrido foram coletadas em pré-antese, com ovários medindo entre 0,3-0,4 cm, e fixadas por 24 h em líquido de Carnoy. Foi utilizada a técnica de clearing (Herr, 1982), que consiste em remoção dos óvulos sob lupa, desidratação em série etanólica (70, 80, 90 e 100%), durante uma hora em cada solução; tratamento com benzil benzoato quatro e meio (BB 4 1/2), consistindo de ácido láctico, cloro hidratado, fenol, óleo de cravo, xileno e benzil benzoato nas proporções 2:2:2:2:1:1 (p/p), durante 24 h, embebição dos óvulos em solução de metil salicilato (100%) e BB

4^{1/2} na proporção 1:1 v/v, para se obter maior contraste (Ogburia & Adachi, 1994); observação dos óvulos íntegros e clarificados ao microscópio de luz Olympus BX 50. As imagens foram captadas pelo software HonestechTVR 2.5.

De cada ovário foram retirados 3 óvulos, sendo que cerca de 200 óvulos de cada híbrido foram analisados. Os óvulos que apresentaram saco multiembrionário foram classificados como apomíticos. A determinação da taxa de apomixia para cada híbrido consistiu na porcentagem advinda da razão entre óvulos apomíticos e total analisado x 100.

Análise Anatômica do Caule

Segmentos de caule de cerca de 10 cm foram coletados entre o terceiro e o sétimo entrenós a partir do ápice de cinco indivíduos de cada híbrido, sendo cerca de seis amostras por indivíduo. Procederam-se também análises em regiões de crescimento primário para caracterização do sistema vascular.

A fixação foi feita com FAA 70% e depois de 24 h procedeu-se a transferência para álcool 70% (Johansen, 1940). As secções transversais foram realizadas a partir de cortes à mão livre em micrótomo de mesa (R. Jungag Heidelberg) (Fig. 2D). A clarificação foi feita com solução de hipoclorito de sódio 50% (Kraus & Arduin, 1997) e a coloração (Fig. 2E) em azul de alcian e safranina 1% na proporção 1:5 (Luque *et al.*, 1996).

Os cortes foram desidratados em série etílica até etanol absoluto e a diafanização feita em acetato de butila etanólico 50% e, posteriormente, acetato de butila 100%. A montagem das secções foi feita entre lâmina e lamínula utilizando como meio a resina sintética (Paiva *et al.*, 2006). Realizou-se análise de trinta lâminas por híbrido.

Amostras de macerado foram feitas para ambos os híbridos para observação dos elementos de vaso. Pequenos pedaços de caule foram colocados a 60°C, imersos em solução de Franklin (1945) por 72 h, até se tornarem macios e sem pigmentação. Eles foram macerados, e amostras de dissociados foram montadas em resina sintética após passadas por série

etanólica. O critério para classificação por tamanho dos elementos de vasos foi baseado em Frost (1930), sendo que os elementos de vaso considerados pequenos estavam compreendidos entre 0,1-0,3 mm; os médios entre 0,4-1,3 mm; os grandes entre 1,4-2,0 mm. Calcularam-se as freqüências de tamanho para cada híbrido a partir de razão entre a quantidade de elementos de vasos com determinado tamanho e o total de elementos contados, multiplicado por 100.

Testes histoquímicos foram realizados para a detecção de cristais de carbonato de cálcio com ácido clorídrico a 10%, de oxalato de cálcio com ácido sulfúrico a 10% (Strassburger, 1943), e também para a detecção de grãos de amido com lugol (Jensen, 1962), de suberina e látex com Sudan III e Sudan IV (Sass, 1951) e lignina com cloreto de zinco iodado (Johansen, 1940).

As fotomicrografias foram tiradas usando-se microscópio ótico Zeiss Axioskop, e as imagens foram capturadas com o software Motion Image Plus 2.0.

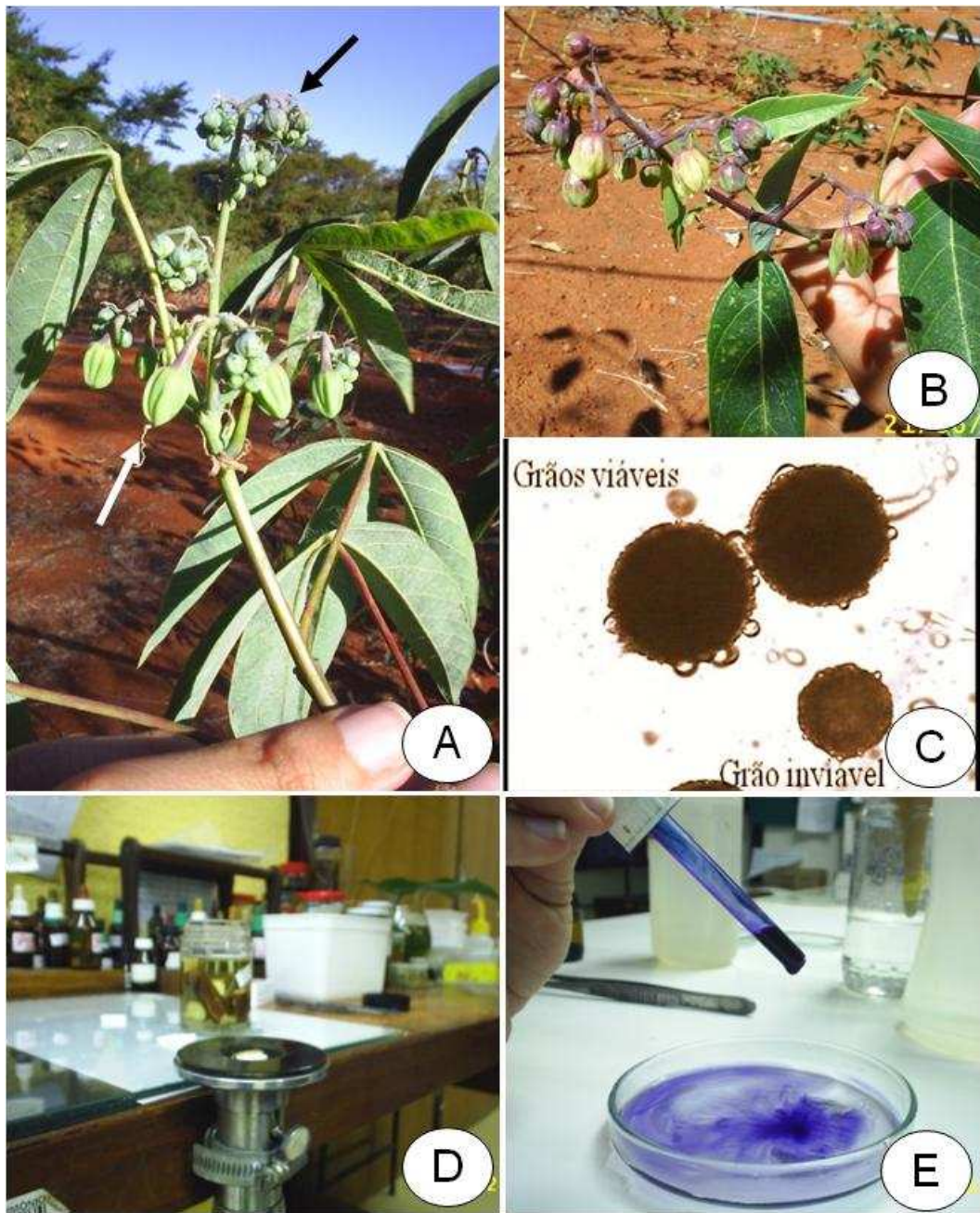


Fig. 2. A. Inflorescência do híbrido *M. esculenta* x *M. oligantha* com botões masculinos (seta preta) e femininos (seta branca). B. Inflorescência com botões masculinos em pré-antese, em sua maioria, aptos para análise de viabilidade de pólen. C. Grãos de pólen de mandioca corados para análise de fertilidade das plantas. D. Segmentos de caule e micrótomo de mesa usados para produção de cortes transversais e longitudinais. E. Fase de coloração dos cortes caulinares com safranina-alcian blue.

RESULTADOS

Descrições morfológicas

(Figs. 3 e 4)

- Híbrido ICB 300 diploide (adaptado de Nassar & Sousa, 2007) (Figs. 3A, 3B, 4A, 4C e 4D)

Arbusto de 2-2,5 m, ramificado. Raízes tuberosas cilíndricas de ca. 30 cm de compr. por 12 cm de diâmetro, superfície lisa, marrom escura. Caule primário verde-arroxeadado, glabro. Caule secundário de coloração marrom-prateada, com cicatrizes foliares proeminentes e distância entre elas de 5-10 cm, glabro. Estípula decídua, de cerca de 0,3-0,5 cm, lanceolada, inteira. Pecíolo roxo esverdeado, de 18-23 cm de comprimento, com inserção basal ao limbo. Folhas alternas, lâmina membranácea, 17-23 cm de compr., lâmina palmatissecta de 3-7 lóbulos, não sobrepostos, margem inteira, lóbulo médio oblongo, ca. 4 cm de larg., ápice agudo a acuminado, venação camptódroma. Dimorfismo foliar observado, com lâminas unilobuladas e multilobuladas. Inflorescência monóica, em panícula, de 3-5 cm, 5-7 ramificações, glabra, brácteas e bractéolas setáceas, margens inteiras, amarela esverdeadas com traços de pigmentação roxa. Flores femininas restritas à base da inflorescência, freqüentemente de 2-3 flores em cada grupo de flores masculinas, formato piramidal, tamanho ca. três vezes maior que a flor masculina. Disco nectarífero alaranjado, glabro, ovário subgloboso, tricarpelar, não alado. Flores masculinas de formato ovóide-elipsóide, tépalas de ca. 0,5-1,0 cm de compr., organizadas em grupos de cinco a nove botões florais, com 10 estames para cada botão, sendo cinco com filetes mais curtos e os outros cinco com filetes mais longos, variando de 0,3-0,9 cm de compr. Filetes e anteras de cor branca, pedicelos de ca. 1,5 cm com coloração verde arroxeadada. Fruto arredondado, superfície lisa com seis asas moderadamente proeminentes, tamanho de aproximadamente 2,3 cm (do ápice à base), pedicelo robusto, deiscência septícida. Semente carunculada, de 1-1,4 cm de compr., oblonga.

- Híbrido ICB 300 tetraploide (Figs. 3D-3E; 4B e 4E)

Arbusto de 2-2,5 m, ramificado. Raízes tuberosas cilíndricas, de ca. 50 cm de compr. por 9 cm de diâmetro, superfície lisa, marrom escura. Polpa branca, odor fraco de HCN. Caule primário verde-arroxeadado, glabro. Caule secundário de coloração marrom-prateada, com cicatrizes foliares proeminentes e distância entre elas de 4-8 cm, glabro. Estípula decídua, de ca. 0,3-0,5 cm, lanceolada, inteira, glabra. Folhas alternas. Pecíolo roxo esverdeado, de 20-23 cm de compr., com inserção basal ao limbo, glabro. Lâmina membranácea, 18-23 cm de compr., palmatissecta de 3-7 lóbulos, (usualmente 3 maiores e 4 menores), não sobrepostos, margem inteira, formato do lóbulo médio oblongo, 7cm de larg., ápice agudo a acuminado, venação camptódroma. Inflorescência monóica, em panícula, 5-7 ramificações, glabra, brácteas e bractéolas setáceas, margens inteiras, amarela esverdeadas com traços de pigmentação roxa. Flores femininas restritas à base da inflorescência, freqüentemente de duas a três flores para cada conjunto de flores masculinas, formato piramidal, tamanho cerca de 3 vezes maior que a flor masculina, cinco tépalas de dimensões de 1 x 0,5 cm. Pedicelos de ca. 1,5 cm. Disco nectarífero alaranjado, glabro, ovário subgloboso, tricarpelar, alado. Flores masculinas de formato ovóide-elipsóide, tépalas de ca. 0,5-1,0 x 0,7 cm, em grupos de cinco a nove botões florais, com cerca de dez estames, sendo cinco com filetes curtos e os outros cinco com filetes longos (entre 0,3-0,8 cm de compr.). Filetes e anteras de cor branca, pedicelos de ca. 1,5 cm com coloração verde arroxeadada. Fruto arredondado, superfície lisa com seis asas moderadamente proeminentes, tamanho de aproximadamente 2,5 cm (do ápice à base), pedicelo robusto, deiscência septicida. Semente carunculada, de 1-1,5 cm de comprimento, oblonga.

Análise Citogenética

(Fig. 5)

Comportamento Cromossômico Meiótico

O exame da metáfase I da meiose nos esporocitos revelou que o híbrido ICB 300 diploide apresenta 18 bivalentes e número cromossômico somático igual a 36 (Fig. 5A). Vários horários de coleta foram experimentados, e constatou-se que às 8 h da manhã é o melhor horário, pois é nele que se encontra maior frequência de divisões meióticas.

No híbrido tetraploide foram observados 72 cromossomos (Fig. 5B), com prevalência de associações bivalentes. Foram contados cromossomos em associações de 28 bivalentes e 4 quadrivalentes.

Viabilidade de Pólen

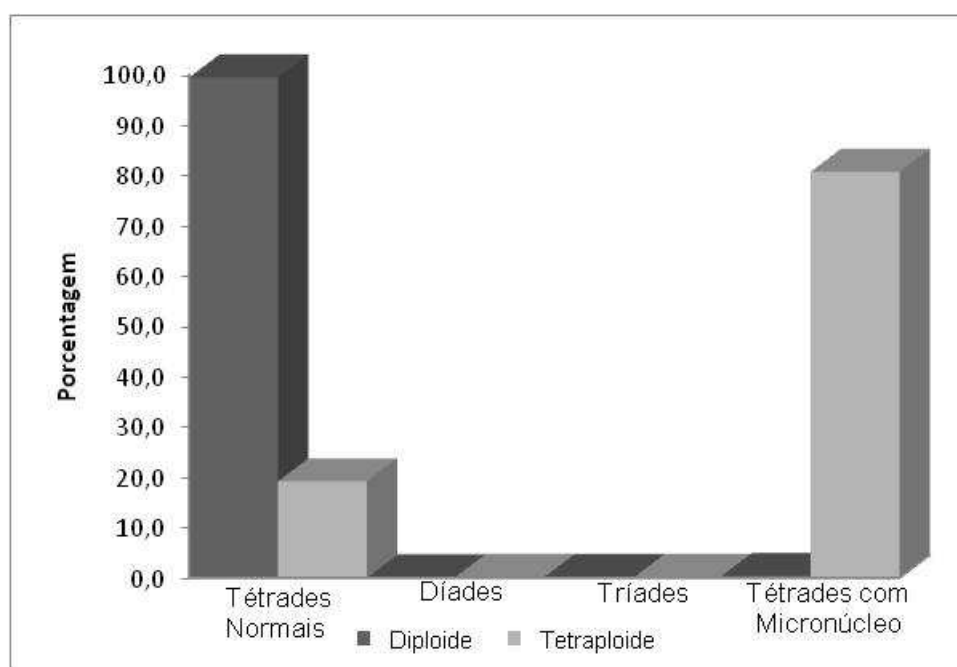
Foram analisados 30 botões de cada um dos híbridos. Os totais de grãos contados de cada híbrido, assim como a porcentagem média de viabilidade da planta, desvio padrão dessa porcentagem e média de grãos por lâmina podem ser verificados na Tabela 1. Os grãos corados do híbrido diploide e do tetraploide podem ser vistos nas Figs. 5C e 5D.

Tab. 1. Viabilidade de pólen dos híbridos ICB 300 diploide (2n) e tetraploide (4n) entre *M. esculenta* x *M. oligantha*.

	2n	4n
Total de grãos contados	9738	23398
Média de grãos por lâmina	324,6	779,9
Viabilidade média (%)	83,5	64,8
Desvio padrão	22,5	11,6

A observação de esporocito (Figs. 5E e 5F) em suas etapas finais de divisão revelou taxas significativamente diferentes para os híbridos (Graf. 1). A presença de micronúcleos (Fig. 5F) pôde ser constatada em ambos os híbridos, porém, em maior quantidade no tipo poliploidizado.

Graf. 1. Porcentagens de esporocitos normais e anormais dos híbridos diploide e tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. Total observado de 1176 esporocitos no diploide e 1065 no tetraploide.



Análise Anatômica do Óvulo (Fig. 6)

Foi analisado um total de 419 óvulos dos dois híbridos (Tab. 2). O tipo diploide apresentou óvulos não-apomíticos (Fig. 6A) e multiembriônicos (Fig. 6B), assim como o híbrido tetraploide (Fig. 6C).

Tab. 2. Quantidade de óvulos analisados e porcentagem de apomixia calculada dos híbridos diploide e tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*.

Híbrido	Não Apomítico	Apomítico	Total	Apomixia (%)
Diploide	213	6	219	2,7
Tetraploide	164	36	200	18,0

Análise Anatômica do Caule (Figs. 7 a 15)

Os tecidos caulinares dos híbridos mostraram a epiderme interrompida por periderme, com diferentes camadas de felema e escassas lenticelas. O parênquima cortical apresentou drusas, cristais prismáticos e laticíferos.

Nos cortes transversais, os caules dos híbridos apresentaram-se circulares, revelando crescimento secundário pela presença de felogênio e câmbio vascular (Figs. 7A e 7D).

O colênquima angular apresentou células organizadas em até cinco camadas, seguidas de células parenquimáticas contendo cristais prismáticos, drusas e grãos de amido, o qual forma uma camada amilífera. Em testes histoquímicos (Fig. 12), no híbrido diploide, observou-se maior quantidade de amido que no tetraploide (Fig. 13).

As fibras pericíclicas dispuseram-se em um cilindro, diferenciável pela espessura das paredes celulares (Figs. 7B e 7E). O híbrido ICB 300 tetraploide revelou conteúdos variáveis de lignina e também diferentes espessuras de parede celular, enquanto o diploide mostrou parede celular aparentemente mais espessa (Fig. 14). As fibras da amostra diploide apresentaram grãos de amido, sendo que em algumas também se pôde notar septos.

O floema secundário foi representado por elementos de tubo crivado, células companheiras e laticíferos, enfileirados em pequenos grupos entre outras células (Figs. 7C e 7F). Os raios de células parenquimáticas mostraram-

se contínuos com os do xilema secundário. O câmbio vascular pôde ser identificado com facilidade, exibindo células em diferenciação.

No xilema secundário, observaram-se elementos de vaso, fibras, parênquimas radial, axial vasicêntrico e paratraqueal (escasso). Os elementos de vaso se encontraram dispostos isoladamente (formato circular) ou em grupos (angulosos), e em alguns cortes do híbrido diploide puderam ser vistas tiloses, enquanto que elas foram muito raras no tetraploide (Figs. 8A e 8D). As células do parênquima radial eram retangulares e estavam dispostas em fileira. As fibras xilemáticas possuíam paredes celulares pouco lignificadas (Fig. 14), lume celular amplo e formato retangular, similar às células parenquimáticas (Figs. 8B e 8E). Além dessas estruturas, havia também densas camadas enfileiradas de tecido, remanescentes de anéis de crescimento secundário (Fig. 7A).

O xilema primário apresentou elementos de protoxilema e metaxilema, sendo circundado por células de parênquima (Figs. 8C e 8F). Elas estavam seguidas por floema primário interno, com elementos de tubo crivado, células companheiras e laticíferos. Ele revelou-se diferenciado: o protoxilema em estágio mais avançado, os elementos menores e com paredes espessas e os mais distais colapsados. No metaxilema, os elementos revelaram-se maiores com paredes delgadas, o tecido xilemático envolvido por tecido parenquimático de células pequenas com paredes delgadas sem conteúdo celular aparente. Mais internamente ao xilema primário notaram-se constituintes do floema primário interno (elementos crivados, células companheiras e laticíferos) dispersos em tecido parenquimático (Fig. 10C). Observou-se no híbrido tetraploide o mesmo padrão, entretanto, no xilema primário, as paredes celulares eram mais espessas e o floema interno em estágio avançado com maior quantidade de células (Fig. 10F).

Mais detalhadamente sobre o sistema vascular, este apresentou um cilindro de floema primário externo e xilema primário disposto em cinco feixes, seguidos pelo floema primário interno (Figs. 10A e 10D). Entre o floema primário e o xilema secundário observou-se o câmbio se diferenciando (Figs. 10B e 10E). O floema primário externo, disposto em cordões, apresentou

aproximadamente seis camadas de células diferenciando-se, e em alguns locais puderam ser identificados elementos crivados, células companheiras, células parenquimáticas e laticíferos; esses cordões mostraram-se separados entre si por pequenas células parenquimáticas que formavam um cilindro.

Cortes longitudinais do caule tetraploide mostraram laticíferos articulados e ramificados, distribuídos pelo córtex e também nos floemas secundário (Figs. 9A, 9B, 9D e 9E) e primário (Figs. 9C e 9F). Eles apresentaram-se escassos no parênquima cortical e abundantes no floema secundário. Em comparação, o híbrido tetraploide apresentou maior número de laticíferos em todos os tecidos. Testes histoquímicos revelaram presença de látex no floema interno de ambos os híbridos (Figs. 15B e 15D).

A medula revelou duas regiões distintas por aspectos de formato celular, conteúdo e número de camadas. A região periférica, próxima ao xilema primário, apresentou células isodiamétricas. A região central mostrou células poligonais com cinco ou seis faces. O conteúdo e número de camadas celulares variaram de acordo com a ploidia do caule (Figs. 11A e 11D). Na medula periférica do tipo tetraploide foram observadas cerca de seis camadas de células parenquimáticas poligonais isodiamétricas a alongadas (quatro a sete faces); no diploide observaram-se até sete camadas de células contendo grãos de amido e drusas. Na medula central do híbrido tetraploide, as células parenquimáticas vistas foram do tipo poligonal alongado, com raro conteúdo citoplasmático; no diploide as células eram menores, contendo drusas, grãos de amido e cristais prismáticos.

O híbrido diploide apresentou cristais prismáticos e drusas no parênquima cortical, no floema secundário, no parênquima radial, nas fibras xilemáticas e na medula periférica, sendo que a maior quantidade de cristais prismáticos foi observada na bainha amilífera, enquanto eles foram raramente observados no híbrido tetraploide (Figs. 7B e 7E). Os cristais encontrados são compostos por oxalato de cálcio.

Observaram-se nos floemas primário e secundário do híbrido tetraploide células cerca de 3-4 vezes maiores que no diploide (Figs. 7B, 7C, 7E e 7F), e

dispostas em maior número de camadas (Figs. 7A e 7D). Em ambos observou-se a presença de suberina (Figs. 15A e 15D).

O aumento no volume celular foi observado também no xilema secundário. O diâmetro dos elementos de vaso e das células parenquimáticas axiais, radiais e dos elementos de tubo crivado do floema secundário no tipo tetraploide se apresentaram maiores que no diploide (Figs. 8B e 8E). Em termos quantitativos, observaram-se na planta tetraploide tecidos vasculares secundários maiores na diploide, em especial com relação ao floema secundário e ao xilema.

No tipo diploide, os elementos de vaso eram simples e apareceram em maior número, frequentemente com tiloses (Fig. 8A). O xilema primário foi marcado pela presença de grãos de amido e ausência de tiloses (Fig. 8C). As fibras eram menores em comprimento e com paredes densamente espessadas, contendo amido (Figs. 8B e 8E).

Os dados descritivos e principais diferenças anatômicas entre os híbridos estão apresentados na Tabela 3.

Tab. 3. Principais características anatômicas do caule dos híbridos diploide e tetraploide entre *Manihot esculenta* e *M. oligantha*.

	DIPLOIDE	TETRAPLOIDE
Parênquima cortical Idioblastos	5-6 camadas Cristais, drusas e grãos de amido em abundância	5-7 camadas Cristais, grãos de amido e drusas raros
Bainha amilífera	Drusas e cristais em abundância	Drusas e cristais raros
Fibras pericíclicas	2-4 camadas com parede significativamente espessada	1-4 camadas com parede moderadamente espessa
Floema	7-19 camadas, células menores Grãos de amido e drusas pouco frequentes	Até 26 camadas, células com diâmetro 3-4 vezes maior que no diploide Grãos de amido e drusas em abundância
Anéis de crescimento	2-3 anéis bem definidos	Anéis de crescimento

		conspícuos
Grãos de amido, cristais prismáticos e drusas no xilema secundário	Observados no parênquima radial e nas fibras Drusas e cristais raros	Confinados no parênquima radial somente Drusas e cristais ausentes
Células parenquimáticas radiais	Alongadas com parede espessada contendo amido em abundância	Cúbicas a alongadas contendo amido
Elementos de vaso	Simplestes com formato circular a elíptico Vasos pequenos em diâmetro Tipo agrupado mais frequente	Simplestes com formato circular e amplos em tamanho Cerca de 50% maiores que no diploide Tipo solitário mais frequente
Tiloses	Encontradas em quase todos os elementos de vaso	Raras
Medula periférica	Células isodiamétricas Cristais, grãos de amido e drusas presentes	Células isodiamétricas Raros grãos de amido
Medula central	Células poligonais esféricas, raras drusas	Células poligonais alongadas

Predominaram no híbrido diploide (Figs. 11B e 11C) os elementos de vaso do tipo reticulado, de tamanho médio; pequenos e grandes foram raros (Tab. 4). As placas de perfuração foram do tipo simples com terminação oblíqua. As fibras vistas foram as do tipo libriforme com abundante conteúdo de amido (Fig. 11C). No híbrido tetraploide (Figs. 11E e 11F), puderam ser observados elementos de vaso do tipo reticulado, de tamanhos pequeno, médio e grande, prevalecendo os médios e grandes, com pouco conteúdo de amido. Eles apresentaram terminação reta e também oblíqua, revelando, algumas vezes, apêndices em somente uma ou em ambas as extremidades. Os parênquimas radial e axial mostraram conteúdo de amido (Fig. 11G).

Tab. 4. Elementos de vaso dos híbridos diploide e tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha* e porcentagens relacionadas ao comprimento observado. *

Híbrido	Comprimento	Perfuração	Tipo	Total Contado	Porcentagem
Diploide	Pequeno	Simples	Reticulado	4	6,6
	Médio	Simples (50)	Reticulado (49)	51	83,6
		Escalariforme (1)	Pontuações alternas (2)		
	Grande	Escalariforme	Reticulado	6	9,8
Total				61	100
Tetraploide	Pequeno	Simples	Reticulado	10	13,3
	Médio	Simples (47)	Reticulado (46)	48	64
		Escalariforme (1)	Pontuações alternas (2)		
	Grande	Simples (15)	Reticulado (9)	17	22,7
		Escalariforme (2)	Pontuações alternas (5)		
			Pontuações opostas (2)		
			Escalariforme (1)		
Total				75	100

* Números entre parênteses indicam o total de elementos de vaso contados; medidas adotadas para classificação por diâmetro dos elementos de vaso: pequeno (0,1-0,3 mm), médio (0,4-1,3 mm), grande (1,4-2,0 mm), conforme Frost (1930).

DISCUSSÃO

Análise Citogenética

Comportamento Cromossômico Meiótico

O exame da metáfase I do híbrido ICB 300 tipo diploide mostrou número haplóide de 18, isto é, número somático de 36. Esses resultados estão de acordo com registros de Graner (1935), Abraham (1944), Cruz (1968), Sohmer (1968), Magoon *et al.* (1969), Nassar (1978e) e Nassar *et al.* (1995), no que se refere ao número cromossômico da mandioca e da espécie silvestre *M. oligantha*. Ambos têm número cromossômico diploide de 36.

O pareamento cromossômico de 18 bivalentes mostra afinidade entre a mandioca e a espécie silvestre *M. oligantha*. Esse resultado está de acordo com Nassar (1978g), que mostrou claramente que o material usado na hibridização não é *M. oligantha* pura, mas um produto de hibridização e introgressão entre *M. oligantha* e *M. esculenta*. Introgressão é a transferência de material genético de uma espécie através de sucessivas hibridizações unidirecionais, devido a uma barreira interespecífica incompleta, normalmente através de um híbrido F₁ parcialmente estéril, por retrocruzamentos repetidos e seleção dos tipos retrocruzados de interesse (Anderson, 1949).

Aplicando-se o conceito de Harlan (1976), a introgressão é resultado de hibridizações seguidas, ocorridas em várias gerações entre *M. oligantha* e *M. esculenta*. No padrão introgressivo de *M. oligantha*, ela seria o parental usado nos retrocruzamentos, dando no final um tipo modificado de *M. oligantha*. Esse híbrido incorporou genes de *M. esculenta*, apresentando uma razoável compatibilidade e pareamento regular de 18 bivalentes na metáfase I, conforme evidenciado pela formação de tétrades normais com porcentagem de mais de 99%. A alta viabilidade do pólen de 83,5% mostrou alto nível de compatibilidade com esse pareamento regular na metáfase I, indicando que houve segregação regular de homólogos na anáfase I.

A formação de bivalentes é geralmente utilizada como indicador do grau de parentesco entre espécies e da maior probabilidade de transferência de genes

entre elas (Estilai, 1977; Baksh, 1979; Kumar *et al.*, 1988). Assim como já afirmado por Nassar (1978g), o parental com conjunto gênico de *M. oligantha* já era um híbrido natural com *M. esculenta*, tendo havido introgressão na formação de ICB 300 diploide.

Nassar (1978g) acredita que esse mecanismo de introgressão é o responsável pela origem do tipo de *M. oligantha* usado por ele (híbrido ICB 300). O exame citogenético de ICB 300 neste trabalho confirma a teoria de Nassar sobre o tipo introgressivo de *M. oligantha*, pois o pareamento cromossômico foi regular e a viabilidade de pólen alta. A vantagem de se usar tipos híbridos e não espécies silvestres puras foi enfatizada por vários autores como Harlan (1961 e 1976), Hawkes (1981) e Rick (1976).

O exame da metáfase I no tipo poliplóide mostrou número cromossômico de 28 bivalentes e 4 quadrivalentes, confirmando a natureza tetraploide desse híbrido. A formação de quadrivalentes é um indicador de parentesco entre os dois tipos parentais (Kumar *et al.*, 1988). Possivelmente, a formação de poucos multivalentes refere-se à natureza híbrida da planta poliploidizada (Alley, 1957). Com a formação de multivalentes, a viabilidade de pólen do tipo poliplóide foi de 64,8%, um pouco menor que o encontrado no tipo diploide.

Stebbins, em seu trabalho clássico (1950), explicou que podem existir dois tipos principais de poliplóides: os autopoliplóides, gerados pela duplicação cromossômica de um único ancestral e que possuem semelhanças estreitas com o mesmo; e os alopoliplóides, que são os poliplóides que contêm dois complementos cromossômicos diferentes e duplicados, podendo por isso produzir esterilidade quando no nível diploide, sendo o último tipo o relacionado à ICB 300. Haveria também os alopoliplóides típicos, derivados de hibridização entre duas ou mais espécies distantemente relacionadas, em que os cromossomos são tão diferentes que não podem parear no híbrido diploide ou formam somente um pequeno número de bivalentes associados.

Morfologicamente, a poliploidização gerou um híbrido bem mais vigoroso que o tipo diploide quanto ao crescimento vegetativo, tamanho das folhas, inflorescências, frutos e raízes, além de cor verde mais escura, característico de tipos poliploidizados em geral (Dermen, 1940; Bali & Tandon, 1959; Grimby, 1973;

Silva *et al.*, 2000; Nakadozono *et al.*, 2007). O aumento de tamanho é interpretado pelos efeitos diretos da poliploidia sobre o tamanho das células. Assim, por apresentar características predominantemente de *M. esculenta*, como altura, disposição das folhas e reprodutivamente ser uma planta monóica, além de possuir aspectos marcadamente indicadores de *M. oligantha*, como o alto conteúdo de 4,5% de proteína na raiz (Nassar & Dorea, 1982), corroboram-se os fatos de que o híbrido diploide é fruto de introgressão gênica resultante de uma hibridização ocorrida no passado.

As cores mais escuras das folhas podem estar relacionadas à densidade de antocianina ou clorofila ou de ambos os pigmentos (Thomas & Hill, 1937), influenciando nos processos de fotossíntese. Stebbins (1985), Dhawan & Lavania (1996) e Udall & Wendel (2006) relacionaram a poliploidia ao aumento do conteúdo de matéria seca, proteínas, vitaminas e minerais, possivelmente pela dosagem cromossômica aditiva notada nos poliplóides. Aspectos nutricionais como os encontrados em ICB 300 podem ter seu conteúdo aumentado com a duplicação do nível de ploidia do híbrido. Assim, não seria inesperado encontrar no híbrido tetraploide ainda maiores conteúdos de proteína, acima dos 4,5% aferidos no híbrido diploide (Nassar & Dorea, 1982).

Viabilidade de Pólen

Análises de fertilidade de híbridos interespecíficos de mandioca (F_1) feitos anteriormente por Nassar (1992-2005) indicaram baixa viabilidade de pólen comparada ao encontrado no híbrido ICB 300 diploide. Nassar (2005) relatou baixa fertilidade do híbrido interespecífico entre *M. glaziovii* e mandioca, que chegou a 10%. Em ICB 300, a viabilidade alcançou 83,5%, caracterizando uma alta fertilidade, que pode ser atribuída à natureza introgressiva de sua formação. Outros relatos indicaram baixa viabilidade de pólen em híbridos de mandioca, tais como com *M. pseudoglaziovii* (Nassar, 1992), *M. glaziovii* (Nassar, 1996) e *M. dichotoma* Ule (Nassar *et al.*, 1997).

Jennings (1963) relatou alta fertilidade na primeira geração de híbridos de mandioca e de algumas espécies silvestres. Bolhuis (1953), Jennings (1959) e Magoon *et al.* (1970) também relataram facilidade e grande sucesso no

cruzamento de mandioca comum com várias espécies silvestres do mesmo gênero. Aparentemente, conforme interpretação de Nassar (1978g), as plantas usadas pelos referidos autores não era silvestre pura; o mais provável é que eram híbridos naturais introgridos. Rogers & Appan (1973) apóiam a mesma opinião e adicionam que espécies silvestres não são encontradas fora do Brasil. A planta usada por Bolhuis (1953), assim como na maioria dos casos, não seria mais que um escape ou híbrido natural entre a mandioca cultivada e a alguma silvestre.

Considerando-se que *M. esculenta* e *M. oligantha* possuem considerável distanciamento quanto à homologia morfológica, a hibridização no passado, após sucessivos retrocruzamentos com a espécie cultivada possibilitou a estabilidade de pareamentos equilibrados de cromossomos, conferindo ao híbrido ICB 300, a capacidade de produzir, com altas freqüências, gametas e pólen viáveis, conferindo também alto grau de fertilidade à planta diploide.

O tratamento de poliploidização em uma planta consideravelmente estável como ICB 300 diploide produziu a redução de fertilidade do híbrido tetraploide provavelmente por causa de irregularidades na meiose. Stebbins (1950, 1985) cita o efeito de redução da fertilidade em poliplóides, entretanto, assim como outros efeitos causados pela duplicação cromossômica, ela pode variar de acordo com o genótipo do diploide. Algumas variedades tetraploides de milho (*Zea mays* L.) apresentaram de 80-95% de fertilidade (Randolph, 1935, *apud* Stebbins, 1950), e 75-80% de fertilidade foi relatada em autotetraploides produzidos artificialmente pela colchicina em *Ehrharta erecta* Lam. (Stebbins, 1949).

A configuração quadrivalente do poliplóide possivelmente produziu gametas desequilibrados e pólen inviável. Briggs & Knowles (1967) alertam para essa séria limitação de certos poliplóides em relação à produção de pólen que resulta em infertilidade.

A irregularidade meiótica gerada pela poliploidia pode conduzir a outras conseqüências além da esterilidade parcial, uma delas é denominada de restituição meiótica, que resulta em produção de gametas $2n$ (Vorsa & Bingham,

1979; Parrot & Smith, 1984; Sala *et al.*, 1989). Esses gametas, ou díades, foram raramente observados em ICB 300.

A presença de micronúcleos está relacionada ao não-alinhamento cromossômico na placa metafásica (do Valle *et al.*, 2004), sendo essa assincronia a responsável pela formação também de díades e tríades. Para Darlington (1937) e Stebbins (1950), as ocorrências de associações multivalentes estão relacionadas à formação de tétrades anormais. Alley (1957) reportou que tétrades anormais podem estar associadas à presença de univalentes. Aparentemente, qualquer associação multivalente diferente do pareamento bivalente pode interferir na formação de tétrades, e, conseqüentemente, na formação do pólen.

Análise Anatômica do Óvulo

Em ICB 300, tanto diploide quanto tetraploide, notaram-se estruturas apomíticas, com presença de dois embriões por saco embrionário. Aparentemente, um embrião foi gerado a partir de células do saco apomítico e o outro surgiu sexualmente. Em um determinado estágio antes da maturação completa do saco embrionário sexual, ele pode ser abortado e substituído pelo saco apospórico, que, continuando seu desenvolvimento, dará origem a uma semente apomítica.

Caso semelhante a esse encontrado em *Manihot*, usando a mesma técnica de clarificação deste trabalho, foi relatado em *Cenchrus ciliaris* L. (Young *et al.*, 1979) e em *Pennisetum squamulatum* Fresen (Chapman & Busri, 1994). Os resultados demonstram que o tipo de apomixia observado é facultativo, em que a mesma planta é capaz de produzir embriões sexuais e apomíticos (Bashaw, 1980).

Nassar *et al.* (1997), em estudos anatômicos dos óvulos de *M. dichotoma* x *M. esculenta* observaram 2,3% de apomixia de um total de 261 óvulos examinados. O mesmo, em 2001, chegou à conclusão de que a natureza da apomixia em *Manihot* é diferente de outros tipos encontrados por se apresentar em níveis muito baixos (1 a 2%). Comparações entre taxas de

apomixia de plantas diploides e poliplóides foram realizadas por Nassar (2006), que constatou significativo aumento de apomíticos com o aumento da ploidia em híbridos de *M. anomala* Pohl x *M. esculenta*, de zero, na planta diploide, para 29%, no indivíduo poliplóide, assim como entre híbridos de *M. glaziovii* x *M. esculenta*, de 0 a 23% (Nassar & Collevatti, 2005).

ICB 300 diploide apresentou 2,7% de apomixia, enquanto o híbrido tetraploide mostrou 18%. Stebbins (1941) elaborou uma lista de 24 espécies apomíticas, sendo todas poliplóides. No estudo de apomixia em gramíneas, estudos relatam suas associações com ploidias elevadas (Brown & Emery, 1958; Valle & Savidan, 1996). Quarin *et al.* (2001), Matzk *et al.* (2003) e Hojsgaard *et al.* (2008), relataram associação entre apomixia e poliploidia em diversas espécies.

Carman (1997), avaliando a expressão de genes duplicados em angiospermas, chegou à conclusão de que existe uma relação estreita entre apomixia e poliploidia, e que as espécies apomíticas de seu estudo eram poliplóides. Para Nassar (2006), aparentemente, em *Manihot*, a natureza apomítica é influenciada pela poliploidia, assim como foi observado dentre os híbridos ICB 300 deste estudo.

Gustafsson (1947a e 1947b) acreditava que a apomixia era resultado de interações gênicas seguidas de poliploidia em grupos que contêm previamente uma propensão à apomixia. Dessa maneira, a apomixia estaria sob controle genético, mas não necessariamente se manifestaria com a poliploidia, a menos que os genes responsáveis por sua expressão estivessem presentes.

A hibridização parece favorecer indiretamente a apomixia (Swanson *et al.*, 1969) por ser o método mais apropriado para conservar juntos diversos genomas que, ao acaso, têm a própria combinação de fatores para promover a apomixia. Os efeitos heteróticos, frequentemente encontrados nos híbridos, permitem uma maior expansão nos limites de seus hábitos ecológicos que os encontrados nos parentais, e a apomixia tenderia a preservar tais genótipos adaptados através da herança materna.

Análise Anatômica do Caule

Estudos sobre os efeitos da ploidia em estruturas anatômicas de plantas são raros (Stebbins, 1971). Jellings & Leech (1984), Cavalier-Smith (1985) e Sugiyama (2005) contribuíram com alguns estudos.

Jellings & Leech (1984) estudaram a variação em mais de 20 características foliares, incluindo aspectos morfológicos, anatômicos e celulares em nove genótipos de *Triticum* com três níveis de ploidia (diploide, tetraploide e hexaplóide). A característica medida mais fortemente influenciada pelo nível de ploidia foi o tamanho celular, assim como comentado por Stebbins (1950). As células hexaplóides do trigo apresentaram-se muito mais largas que as diploides. O híbrido tetraploide, no presente estudo, mostrou células parenquimáticas muito maiores que as do diploide, dado que corrobora com os resultados de Jellings & Leech (1984).

Stebbins (1971) e Sugiyama (2005) enfatizaram o aumento do tamanho dos órgãos em populações de autotetraploides em duas espécies de *Lolium* e concluíram que o tamanho dos órgãos aumenta com o aumento da ploidia celular, mas o mecanismo de seus efeitos é pouco compreendido. Cavalier-Smith (1985) discutiu o significado do aumento proporcional do volume celular com o aumento do conteúdo de DNA. Eles atribuíram esse aumento ao crescimento balanceado da célula através da manutenção de uma taxa constante entre o volume celular relacionado às transcrições e o volume citoplasmático relacionado à síntese de proteínas.

Cultivares de certas espécies podem apresentar diferenças na densidade e número de camadas das células parenquimáticas. A compactação de tecidos caulinares é um fator físico que promove resistência da planta a insetos (Noris & Kogan, 1980). No híbrido tetraploide analisado, além das células parenquimáticas, observaram-se mais camadas de células colenquimáticas na região cortical.

Na mesma linha, é provável que o híbrido em questão tenha maior potencial de resistência à seca que o tipo diploide. As alterações induzidas pela poliploidia como aumento nas dimensões de estruturas e órgãos, em termos de

número de camadas e tamanho celular, assim como o aumento observado no tecido vascular podem estar relacionadas ao grau de tolerância da planta à seca. Isso se deve provavelmente pelo aumento da capacidade de armazenamento de água nas células.

As fibras possuem alta concentração de lignina na composição de suas paredes celulares (Alves de Brito *et al.*, 1999). Cultivares de uma mesma espécie podem apresentar diferentes quantidades de lignina (Akin, 1989; Silva-Lima *et al.*, 2001a e 2001b; Brito & Rodella, 2002). As fibras são geralmente encontradas na região cortical do tecido caulinar (Dehgan, 1982), mas elas também podem ser encontradas nas regiões interfasciculares. Os híbridos diploide e tetraploide apresentaram uma distribuição de fibras similar à encontrada por Dehgan (1982). A presença de grãos de amido e septos nas fibras provavelmente tem função de reserva, além da função de sustentação.

A ausência de tiloses observada no híbrido tetraploide provavelmente indica a funcionalidade ativa dos vasos condutores, que, aliada à maior quantidade de elementos de vaso no híbrido mencionado, pode conferir à planta melhores condições para condução de água, sais minerais e outras substâncias.

A bainha amilífera neste estudo corresponde a uma endoderme não funcional, pela não observação de estrias de Caspary.

Ambos os híbridos revelaram presença de laticíferos articulados e ramificados. Laticíferos são células especializadas, sendo reconhecidos dois tipos: os articulados, caracterizados por numerosas células superpostas em arranjo de vaso, os quais podem estar conectados por uma rede anastomosada; e os não-articulados, nos quais uma célula apenas cresce de modo intrusivo, ramificando-se durante o desenvolvimento (Mahlberg *et al.*, 1987).

Segundo Metcalfe (1967), a distribuição de laticíferos dentro da planta varia de uma espécie a outra; geralmente eles estão ao longo do tecido vascular, particularmente no floema, onde podem ser distinguidos dos elementos de tubo crivado e das células companheiras; algumas vezes eles podem ser encontrados no tecido parenquimático.

Vannucci (1985) relatou a ocorrência de laticíferos no mesofilo foliar e no floema peciolar de *M. caerulescens* e *M. pilosa*. O autor não apresenta classificação dos laticíferos, entretanto, laticíferos articulados típicos puderam ser observados no caule de *M. caerulescens* (Rudall, 1994).

Metcalf (1967) considerou que os laticíferos não-articulados eram os predominantes na família. Webster (1975) usou a produção de látex e presença ou ausência de laticíferos com um critério para a classificação de Euphorbiaceae em cinco subfamílias. O tipo articulado está restrito a poucas espécies, como *M. glaziovii* e *Hevea brasiliensis* Müll Von Arg. (Rudall, 1994).

Características anatômicas foram consideradas por Pax (1884, *apud* Rogers & Appan, 1973) como um importante critério na classificação de Euphorbiaceae. Ele determinou os laticíferos como caráter que define grupos naturais. Rudall (1994) afirmou que os laticíferos articulados de *Hevea*, *Cnidoscolus*, *Manihot* e outras formas intermediárias de outros gêneros representam o desenvolvimento mais recente a partir do tipo não-articulado.

Nos híbridos diploide e tetraploide, foi observado floema interno em padrão de feixes bicolaterais. Neste tipo de organização, o xilema fica em paralelo com um floema externo e um interno. O floema externo é organizado em um anel contínuo, e o interno em cordões, lado a lado com a região medular. O floema interno pode ser encontrado como um anel contínuo ou em cordões isolados (Metcalf, 1967; Cronquist, 1981), sendo o último observado em *Manihot* no presente estudo.

Feixes bicolaterais ocorrem em caules de várias dicotiledôneas, e, em alguns casos, esta é uma característica de famílias inteiras. Os exemplos mais conhecidos incluem as Cucurbitaceae e Solanaceae (Esau, 1974). Metcalf & Chalk (1983) citam nove gêneros dentro de Euphorbiaceae em que ocorre o floema interno, entretanto, *Manihot* não compôs a lista.

É possível que o floema interno incremente a condução de metabólitos na planta como um todo, trazendo assim grandes vantagens às plantas de deserto, as quais estão submetidas a curtos mas intensos períodos de fotossíntese (Fahn, 1990; Appezzato da Glória, 1993). Entretanto, *Manihot* não é um gênero que comporta plantas de deserto, uma vez que seus centros de

origem se encontram distribuídos pelo Brasil e México (Nassar, 1978f). Esta característica pode estar relacionada a déficit hídrico, insuficiência nutricional e intensidade de luz, de acordo com sua origem.

Estudos sobre as possíveis funções fisiológicas do floema interno incluem uma série de hipóteses. Uma delas estabelece que o floema interno pode exibir diferenças direcionais e temporais de translocação, se comparado ao floema externo da mesma planta (Bonnemain, 1969; Fredon & Bonnemain, 1970; Couillault & Bonnemain, 1973). Outra explicação sugere que existem diferenças na composição celular dos floemas interno e externo (Botha *et al.*, 1975; Botha & Evert, 1978). Hayden & Hayden (1994) afirmam a função evidente de armazenamento representada pelo floema interno em *Croton glandulosus* var. *septentrionalis*.

Todas essas hipóteses convergem ao mesmo ponto: o floema interno em feixes bicolaterais é eficientemente localizado para o transporte de assimilados da medula ou para a medula. Esta é a mais significativa hipótese para a função do floema interno.

Em *Manihot*, a caracterização do floema interno é relevante aspecto quando relacionada ao seu melhoramento. Mesmo possuindo uma vasta distribuição pela América do Sul (Nassar, 1978f; Nassar *et al.*, 2008a), o gênero tem poucos representantes cultivados que são resistentes à seca. O estudo anatômico é uma ferramenta útil, podendo ser usada para detectar espécies resistentes à seca.

Higley (1880) relatou a presença de drusas e cristais em Euphorbiaceae. Ele considerou que as ráfides eram mais abundantes nas folhas, enquanto as esferoráfides eram mais comuns no caule. Nos híbridos analisados, as ráfides não foram detectadas, somente cristais primáticos e drusas. De acordo com Franceschi & Horner (1980), os cristais têm morfologias distintas incluindo forma acicular ou de ráfide, agregados esféricos (drusas) e prismáticos.

A função dos cristais não é completamente entendida; o significado funcional dos cristais de oxalato de cálcio varia de acordo com a morfologia do cristal e sua distribuição nos tecidos das espécies (Franceschi & Horner, 1980). Podemos assumir que eles estão controlando a rigidez do tecido e agindo

como depósito de regulação da concentração de cálcio e/ou oxalato solúvel. Franceschi & Horner (1980) sugerem que a formação dos cristais de oxalato de cálcio nas plantas pode estar relacionada com a evaporação da água.

De acordo com Bailey (1944), a redução no tamanho dos elementos de vaso assim como a presença de elementos reticulados e placas de perfuração simples são características derivadas. As duas últimas características foram observadas nos híbridos de *Manihot*. Para Frost (1930) e Webster (1994), a perfuração escalariforme é característica primitiva dentre as dicotiledôneas. Aparentemente, esses híbridos adquiriram uma forma evolutiva desenvolvida.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em *Manihot*, o tratamento de poliploidização tem trazido grandes perspectivas no sentido de aumentar o vigor da planta, a produtividade das raízes e a tolerância a condições adversas. A poliploidia também influencia a apomixia no gênero, promovendo um aumento de suas taxas.

A primeira hipótese desenvolvida para explicar a causa da apomixia foi a de Ernst (1918, *apud* Stebbins, 1950), que acreditava que ela era gerada pela hibridização entre espécies. Apesar de antiga, essa teoria ainda encontra apoio em evidências de estudo em *Manihot*. Para ele, a evidência da apomixia consiste principalmente em distúrbios meióticos e outros processos no desenvolvimento de sacos embrionários.

Assim, há uma associação entre apomixia, poliploidia e hibridização, que deve ser entendida em uma base indireta, e não com efeitos diretos (Stebbins, 1985; Ozias-Akins & Dijk, 2007). A hibridização promove a apomixia de duas formas: 1) as combinações de genes necessários para iniciar um ciclo apomítico são provavelmente colocadas juntas mais facilmente pela hibridização; 2) o grande vigor e tolerância a amplos espectros de condições ecológicas apresentados pelos genótipos híbridos promovem a vantagem seletiva imediata de um mecanismo que tende à preservação e reprodução dos mais adaptados. Assim, a apomixia agiria como escape das populações híbridas inférteis através da fixação e perpetuação gênica.

Gustafsson (1946) chegou à conclusão de que, enquanto a apomixia pode ser induzida em diploides por mutações genéticas favoráveis, a ação de muitos desses genes indutores de apomixia é mais forte em nível poliplóide que em nível diploide. Estudos com *Manihot* têm evidenciado a forte correlação entre apomixia e poliploidia, assim como relatado nos trabalhos acima. Para a cultura da mandioca, a transferência da apomixia a partir de espécies silvestres e sua fixação pela poliploidia é possível e promissora para o melhoramento da planta. Certamente, através de estudos mais aprofundados, ainda se pode determinar a natureza da apomixia e de sua relação com a poliploidia em *Manihot*.

No presente estudo, o tratamento de poliploidização não resultou em aumento de viabilidade no híbrido tetraploide, provavelmente pela natureza introgressiva de ICB 300 (Nassar, 1978g) que promoveu a formação de configuração cromossômica quadrivalente. A presença de quadrivalentes pôde ter dificultado a ação dos fusos meióticos, resultando na formação de gametas com número cromossômico desequilibrado e, conseqüentemente, reduzindo a taxa de viabilidade da planta. Plantas poliploidizadas podem apresentar esse tipo de problema quando à fertilidade (Briggs & Knowles, 1967).

Os efeitos morfológicos da poliploidia relatados pelos trabalhos clássicos de Stebbins (1950, 1971 e 1985), Jellings & Leech (1984) e Sugiyama (2005) vêm sendo notados claramente na mandioca a respeito do vigor da planta e quantidade de raízes. O uso de híbridos interespecíficos em processo de poliploidização abriu um amplo conjunto disponível de variabilidade genética, como a possibilidade de incremento no conteúdo proteico através da utilização do híbrido *M. esculenta* x *M. oligantha*.

Em termos anatômicos, a poliploidização gerou efeitos marcantes, sobretudo quanto ao tamanho celular, assim como observado por Stebbins (1985). Células maiores, com maior conteúdo de metabólitos e maior espessura de camadas de proteção, dentre outros aspectos, podem conferir ao híbrido poliplóide maior potencial de resistência à seca e a insetos. Além disso, a ocorrência de floema interno no caule, isto é, mais um elemento para condução de metabólitos e água, coloca os híbridos estudados como candidatos-alvo em programas de melhoramento para desenvolvimento de cultivares resistentes à seca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- _____. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores 2006. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>; acessado em 12/12/08.
- ABRAHAM, A. Natural and artificial polyploids in tapioca (*Manihot esculenta*). **Proceedings of the 32nd International Scientific Congress Association**. 1944.
- AKIN, D. E. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. **Agronomy Journal**, 81: 17-25. 1989.
- ALLEY, C. Cytogenetics of *Vitis*. II. Chromosome behavior and the fertility of some autotetraploid derivatives of *Vitis vinifera* L. **Journal of Heredity**, 48(5): 195-202. 1957.
- ALVES DE BRITO; RODELLA, C. J. F. A.; DESCHAMPS, R. A.; & ALQUINI, Y. Anatomia quantitativa e degradação *in vitro* de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) (Poaceae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 40: 661-671. 1999.
- AMORIM, A. C. F. **Comportamento de progênies de clones híbridos apomíticos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Brasília: Dissertação de Mestrado. 1998.
- ANDERSON, E. **Introgressive hybridization**. New York, Wiley and Sons. 109 pp. 1949.
- APPEZZATO da GLÓRIA, B. **Caracteres anatômicos e ultraestruturais dos órgãos vegetativos de *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e de *M. velutina* (Mart. Ex Stadelm.) Woodson – Apocynaceae**. São Paulo: Tese de Doutorado. 1993.
- ASKER, S. E. Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation. **Hereditas**, 93: 277-293. 1980.
- ASKER, S. E. & JERLING, L. Progress in apomixes research. **Hereditas**, 91: 231-240. 1979.
- ASKER, S. E. & JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press. 1992.

- BAILEY, I. W. The development of vessels in angiosperms and its significance in morphological research. **American Journal of Botany**, 31: 421-428. 1944.
- BAKER, R. E. **Induced polyploidy periclinal chimeras in *Solanum tuberosum***. University of Nebraska: Monografia. 1959.
- BAKSH, S. Cytogenetic studies on the F1 hybrid *Solanum incanum* L. x *Solanum melongena* L. variety 'Giant of Banoras'. **Euphytica**, 28: 793-800. 1979.
- BALI, P. N. & TANDON, S. L. Morphological and cytological studies of the induced polyploids in *Alyssum maritimum* Lam. **Genetica**, 30(1): 129-139. 1959.
- BARROS, E.A. & BRESSANI, R. Chemical composition of the roots and leaves of some varieties of *Manihot*. **Turrialba**, 17: 314-320. 1967.
- BASHAW, E. C. Apomixis and its application in crop improvement. In: Hybridization of crop plants. **American Society of Agronomy and Crop Science Society of America**, 45-63. 1980.
- BAUMGRATZ, J. F. & SILVA, N. M. F. Ecologia da polinização e biologia da reprodução de *Miconia stenostachya* DC. (Melastomataceae). **Rodriguésia**, 64/66: 11-23. 1986.
- BOLHUIS, G. G. A survey of some attempts to bred cassava varieties with a high content of protein in the roots. **Euphytica**, 2: 107-112. 1953.
- BONNEMAIN, J.L. Le phloem interne et le phloem inclus des Dicotyledones: leur histogenese et leur physiologie. **Revue de Génétique Botanique**, 76: 5-36. 1969.
- BORGES, H. B. N. Biologia reprodutiva de quatro espécies de Melastomataceae. São Paulo: Dissertação de Mestrado. 1991.
- BOTHA, C.E.J. & EVERT, R.F. Observations of preferential feeding by the aphid, *Rhopalosiphum maidis*, on abaxial phloem of *Cucurbita maxima*. **Protoplasma**, 96: 75-80. 1978.
- BOTHA, C.E.J.; EVERT, R.F. & WALMSLEY, R.D.. Studies on *Gomphocarpus physocarpus*: further evidence of preferential feeding by the aphid, *Aphis nerii*, on the internal phloem. **Protoplasma**, 84: 345-356. 1975.

- BRETAGNOLE, F. & THOMPSON, J. D. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of alopolyloid plants. **New Phytologist**, 129: 1-22. 1995.
- BRIGGS, F. N. & KNOWLES, P. F. **Introduction to plant breeding**. California. 1967.
- BRITO, C. J. F. A. & RODELLA, R. A. Caracterização morfoanatômica da folha e do caule de *Brachiaria brizantha* (Hoschst. Ex A. Rich.) Stapf e *B. humidicola* (Rendle) Schweick (Poaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, 25(2): 221-228. 2002.
- BROWN, W. V. & EMERY, W. P. H. Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. **American Journal of Botany**, 45(1): 253-263. 1958.
- CARMAN, J. G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, biposporry, tetrasporry and polyembryony. **Biological Journal of the Linnean Society**, 61: 51-94. 1997.
- CARNEIRO, V. T. C. & DUSI, D. M. A. Descrição dos tipos de apomixia. In: **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília. 2004.
- CAVALIER-SMITH, T. Cell volume and the evolution of eukaryotic genome size. In: Cavalier-Smith, **The evolution of genome size**. Wiley & Sons. Chichester. 1985.
- CHAPMAN, G. P. & BUSRI, N. Apomixis in *Pennisetum*: an ultrastructural study. **International Journal of Plant Science**, 155: 492-497. 1994.
- CLOSE, J.; ADRIANENS, E.L.; MOORE, S. & BIGWOOD, E.J. Composition en acides amines d'hydrolyts de farine de manioc variete. **American Bulletin of the Society of Chemistry and Biology Brussels**, 35: 980-985. 1953.
- COLEMAN, L. Nuclear conditions in normal stem tissue of *Vicia faba*. **Canadian Journal of Research**, 28: 382-91. 1950.
- COUILLAULT, J. & BONNEMAIN, J.L. Transport et distribution des assimilats chez *Trapa natans* L. **Physiologie Vegetale**, 11: 45-53. 1973.
- COURSEY, D. G. & HAYNES, P. H. Root crops and their potential as food in the tropics. **World Crops**, 7: 261-265. 1970.

- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** Columbia University Press, New York. 1981.
- CRUZ, N. D. Citologia no genero *Manihot* Adans. 1. Determinacao do numero cromossomico em algumas especies. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, 40: 91-95. 1968.
- D'AMATO, F. Polyploid in the differentiation and functions of tissues and cells in plants. **Caryologia**, 4: 311-58. 1952.
- D'AMATO, F. Endopolyploid as a factor in plant tissue development. **Caryologia**, 7: 41-52. 1964.
- DARLINGTON, C. D. **Recent advances in cytology.** Blackstone. Philadelphia. 1937.
- DEHGAN, B. Comparative anatomy of the petiole and infrageneric relationships in *Jatropha* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, 69(8): 1283-1295. 1982.
- DERMEN, H. Colchicine polyploidy and technique. **Botanical Review**, 6: 599-635. 1940.
- DHAWAN, O. P. & LAVANIA, U. C. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. **Euphytica**, 87(2): 81-89. 1996.
- DO VALLE, C. B.; BONATO, A. L. V.; PAGLIARINI, M. S.; RESENDE, R. M. S. & JANK, L. Apomixia e sua utilização no melhoramento. In: **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília. 2004.
- DOBZHANSKY, T. **Genetics and the Origin of Species.** Columbia University Press. New York. 1951.
- ESAU, K. **Plant anatomy.** Wiley. New York. 1974.
- ESTILAI, A. Interspecific hybrids between *Carthamus tinctorius* and *C. alexandrinus*. **Crop Science**, 17: 800-802. 1977.
- FAHN, A. **Plant anatomy.** New York : Pergamon. 1990.
- FAO. Production Yearbook. Rome. 2006.
- FENNY DANE & TSUCHIYA, T. Meiotic chromosome and pollen morphological studies of polyploidy *Cucumis* species. **Euphytica**, 28: 563-567. 1979.

- FRANCESCHI, V. R. & HORNER, H. T. Calcium oxalate in plants. **Botanical Review**, 46: 361-427. 1980.
- FRANKLIN, G. L. Preparation of thin section of the synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. **Nature**, 155:51. 1945.
- FREDON, J.J. & BONNEMAIN, J.L. Transport du C14 assimile chez le radis a divers stades de son developpement. **Completion Report of the Academic Sciences**, 270(D): 354-357. 1970.
- FROST, F. H. Specialization in secondary xylem of dicotyledons. I. Origin of vessels. **Botanical Gazette**, 89: 67-94. 1930.
- GOLDENBERG, R. Apomixia como alternativa à reprodução sexuada em Melastomataceae. In: Cavalcanti, T. B.; Walter, B. M. T. (eds) **Tópicos atuais em Botânica**. Embrapa Recursos Genéticos, Brasília. 2000.
- GOLDENBERG, R. & SHEPHERD, G. J. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in cerrado vegetation. **Plant Systematics and Evolution**, 211: 13-29. 1998.
- GOLDENBERG, R. & WERPACHOWSKI, J. S. Estudo comparativo da ocorrência de apomixia em Melastomataceae e Asteraceae. In: **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília. 2004.
- GRANER, E. A. **Contribuição para o estudo citológico da mandioca**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 1935.
- GRIMBLY, P. E. Polyploidy in the glasshouse cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Euphytica**, 22(3): 479-483. 1973.
- GUSTAFSSON, A. Apomixis in the higher plants. I. The mechanism of apomixis. **Lunds Univervity Arsskrft**, 42(3): 1-66. 1946.
- GUSTAFSSON, A. Apomixis in higher plants. II. The causal aspect of apomixis. **Lunds University Arsskrift**, 43: 69-179. 1947a.
- GUSTAFSSON, A. Apomixis in higher plants. III. Biotype and species formation. **Lunds University Arsskrift**, 43: 181-370. 1947b.

- HAJJAR, R. & HODGKIN, T. The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. **Euphytica**, 156: 1-13. 2007.
- HANNA, W.W. Method of reproduction in napiergrass and in the 3X and 6X allopolyploid hybrids with pearl millet. **Crop Science**, 21:123-126. 1981.
- HANNA, W. W. & BASHAW, E. C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, 27: 1136-1139. 1987.
- HANNA, W.W. & DUJARDIN, M. Cytogenetic of *Pennisetum schweinfurthii* Pilger and its hybrids with pearl millet. **Crop Science**, 26: 499-553. 1986.
- HANNA, W.W.; GAINES, T.P.; GONZALEZ, B. & MONSON, W.G. Effect of ploidy on yield and quality of pearl millet x napiergrass hybrids. **Agronomy Journal**, 76: 969-971. 1984.
- HARLAN, J. R. Geographic origin of plants useful to agriculture. In: Germoplasm resources. **Publication of American Association for Advancement in Science**, 66: 3-19. 1961.
- HARLAN, J. R. Genetic resources in wild relative crops. **Crop Science**, 16: 329-333. 1976.
- HAWKES, J. G. Biosystematic studies of cultivated plants as an aid to breeding research and plant breeding. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 29(1): 327-335. 1981.
- HAYDEN, S.M. & HAYDEN, W.J. Stem development, medullary bundles, and wood anatomy of *Croton glandulosus* var. *septentrionalis* (Euphorbiaceae). **IAWA Journal**, 15(1): 51-63. 1994.
- HERR, J. M. An analysis of methods for permanently mounting ovules cleared in four-and-a-half type clearing fluids. **Stain Technology**, 57(3): 161-169. 1982.
- HIGLEY, W. K. On the microscopic crystals contained in plants. **American Naturalist**, 14(10): 720-725. 1880.
- HOJSGAARD, D.; SCHEGG, E.; VALLS, J. F. M.; MARTINEZ, E. J. & QUARIN, C. L. Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris* (Poaceae). **Flora**, 203: 535-547. 2008.

- HORSFALL, M. & ABIA, A. A. Sorption of cadmium(II) and zinc(II) ions from aqueous solutions by cassava waste biomass (*Manihot esculenta* Crantz). **Water Research**, 37(20): 4913-4923. 2003.
- JACKSON, R. C. Evolution and systematic significance of polyploidy. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 7: 209-234. 1976.
- JELLINGS, A. J. & LEECH, R. M. Anatomical variation in first leaves of nine *Triticum* genotypes, and its relationship to photosynthetic capacity. **New Phytologist**, 96(3): 371-382. 1984.
- JENNINGS, D. L. *Manihot melanobasis* Müll. Arg. – a useful parent for cassava breeding. **Euphytica**, 8: 157-162. 1959.
- JENNINGS, D. L. Variation in pollen and ovule fertility in varieties of cassava and their effect of interspecific crossing on fertility. **Euphytica**, 12: 69-76. 1963.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. WH Freeman. San Francisco. 1962.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. Mc Graw Hill Book. New York. 1940.
- KAMINSKI, A.; AUSTIN, R. B.; FORD, M. A. & MORGAN, C. L. Flag leaf anatomy of *Triticum* and *Aegilops* species in relation to photosynthetic rate. **Annals of Botany**, 66: 359-365. 1990.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. **Manual Básico em Métodos em Morfologia Vegetal**. EDUR. Rio de Janeiro. 1997.
- KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure Applied Chemistry**, 66: 1003-1010. 1994.
- KUMAR, O. A.; PANDA, R. C. & RAO, K. G. R. Cytogenetic of interspecific hybrids in the genus *Capsicum* L. **Euphytica**, 39: 47-51. 1988.
- LANJOW, J. Two interesting species of *Manihot* L. from Surinam. **Recueil Travaux Botanique Neerlandica**, 36: 542-549. 1939.
- LUQUE, R.; SOUSA, H. C. & KRAUS, J. E. Métodos de coloração de Roeser (1972) – modificado – e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alcião 8GS ou 8GX. **Acta Botânica Brasilica**, 10(2): 199-212. 1996.

- LYNAM, J. Potential impact of biotechnology on cassava production in the third world cassava biotechnology network. **Second International Scientific Meeting**. Indonesia. 1994.
- MAGOON, M. L.; KRISHNAN, R. & VIJAYA BAI, K. V. Morphology of pachytene chromosomes and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. **Cytologia**, 34: 612-626. 1969.
- MAGOON, M. L.; KRISHNAN, R. & VIJAYA BAI, K. V. Cytogenetics of the F1 hybrid between cassava and Ceara rubber and its backcrosses. **Genetica**, 41: 425-436. 1970.
- MAHLBERG, P. G.; DAVIS, D. G.; GALITZ, D. S. & MANNERS, G. D. Laticifers and the classification of *Euphorbia*: the chemotaxonomy of *Euphorbia esula* L. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 94: 165-180. 1987.
- MATZK, F.; HAMMER, K. & SCHUBERT, I. Coevolution of apomixis and genome size within the genus *Hypericum*. **Sex Plant Reproduction**, 16:51–58. 2003.
- MENDONÇA, M. S. Estudo de plantas laticíferas. I. Aspectos anatômicos e distribuição de vasos laticíferos em *Manihot caerulea* Pohl. **Acta Amazonica**, 13: 501-517. 1983.
- MENDONÇA, M. S. Estudo de plantas laticíferas. II. Aspectos anatômicos e distribuição de vasos laticíferos em *Manihot glaziovii* Müll er Arg. **Acta Amazonica**, 22(3): 309-321. 1992.
- METCALFE, C. R. Distribution of latex in the plant kingdom. **Economic Botany**, 21: 115-127. 1967.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Clarendon Press. 1983.
- NAKADOZONO, Y.; BAMBIA, T.; CHEN, R.; NAMIMATSU, S.; NAKAZAWA, Y. & GYOKUSEN, K. Induction and Analysis of Polyploid in *Eucommia ulmoides* Oliver. **International Symposium on Eucommia ulmoides**, 1:112-115. 2007.
- NASSAR, N. M. A. **Cytogenetic studies of polyploidy in Coleus**. Assiut: Tese de mestrado. 1965.

- NASSAR, N. M. A. Wild *Manihot* Species Of Central Brazil For Cassava Breeding. **Canadian Journal of Plant Science**, 58(2): 257-261. 1978a.
- NASSAR, N. M. A. Conservation of the genetic resources of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): determination of wild species localities with emphasis on probable origin. **Economic Botany**, 32: 311-320. 1978b.
- NASSAR, N. M. A. Some further species of *Manihot* with potential value to cassava breeding. **Canadian Journal of Plant Science**, 58: 915-919. 1978c.
- NASSAR, N. M. A. Compatibility of cassava with four wild *Manihot* species from Central Brazil. **Turrialba**, 28: 92-94. 1978d.
- NASSAR, N. M. A. Genetic resources of cassava: chromosome behavior in some *Manihot* species. **Indian Journal of Genetics**, 38(1): 135-137. 1978e.
- NASSAR, N. M. A. Microcenters of cassava diversity in Central Brazil. **Turrialba**, 28: 345-347. 1978f.
- NASSAR, N. M. A. Chromosome number and meiotic behavior of some wild *Manihot* species native to Central Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, 1 (1): 51-58. 1978g.
- NASSAR, N. M. A. Attempts to hybridize wild *Manihot* species with cassava. **Economic Botany**, 39: 13-15. 1979a.
- NASSAR, N. M. A. Wild *Manihot* species of Central Brazil with tolerance to stress condition. **Canadian Journal of Plant Science**, 59: 553-555. 1979b.
- NASSAR, N. M. A. The Need For Germplasm Conservation In Wild Cassava. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, 39 (3): 465-470. 1981.
- NASSAR, N. M. A. *Manihot neusana* Nassar: a new species native to Brazil and its potential for cassava improvement. **Field Crops Research**, 13: 177-184. 1985.
- NASSAR, N. M. A. Broadening the genetic base of cassava, *Manihot esculenta* Crantz, by interspecific hybridization. **Canadian Journal of Plant Sciences**, 69: 1071-1073. 1989.

- NASSAR, N. M. A. Cassava in South America: A Plant Breeder'S View. **Ciência e Cultura**, 44 (1): 25-28. 1992.
- NASSAR, N. M. A. Relationship between *Manihot* species: a review **Proceedings of the Second International Scientific Meeting of Cassava Biotechnology Network**. Bogor. 1994.
- NASSAR, N. M. A. Cytogenetic Behaviour of the Interspecific hybrid of *Manihot neusana* Nassar and Cassava *M. esculenta* Crantz, and its backcross progeny. **Canadian Journal of Plant Science**, Canada 75: 675-678. 1995a.
- NASSAR, N. M. A. Development and Selection for Apomixis. **Ciência e Cultura**, 46: 169-175. 1995b.
- NASSAR, N. M. A. Development of cassava interspecific hybrids for savanna (cerrado) conditions. **Journal of Root Crops**, 22: 9-17. 1996.
- NASSAR, N. M. A. Cytogenetics and evolution of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Genetics and Molecular Biology**, 23 (4): 1003-1014. 2000a.
- NASSAR, N. M. A. The transference of apomixis genes from *Manihot neusana* Nassar to cassava, *Manihot esculenta* Crantz. **Hereditas**, 132: 167-170. 2000b.
- NASSAR, N. M. A. The nature of apomixis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Hereditas**, 134: 185-187. 2001.
- NASSAR, N. M. A. Apomixis and Cassava. **Genetics and Molecular Research**, 1(2): 147-152. 2002a.
- NASSAR, N. M. A. Does Selection Improve Apomixis in Cassava. **Journal of Root Crops**, 28(1): 1-3. 2002b.
- NASSAR, N. M. A. Fertility and chimera induction in cassava interspecific hybrids. **Geneconserve**, 1 (2): 117-123. 2003.
- NASSAR, N. M. A. Polyploidy, chimera and fertility of interspecific cassava (*Manihot esculenta* Crantz) hybrids. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, 64: 132-134. 2004.
- NASSAR, N. M. A. Chromosome doubling induces apomixis in a cassava x *Manihot anomala* hybrid. **Hereditas**, 143: 01-03. 2006.

- NASSAR, N. M. A. Cassava genetic resources and their utilization for breeding of the crop. **Genetics and Molecular Research**, 6: 1151-1168. 2007a.
- NASSAR, N. M. A. Wild and indigenous cassava, *Manihot esculenta* Crantz diversity: An untapped genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 54: 1523-1530. 2007b.
- NASSAR, N. M. A. & COLLEVATTI, R. G. Breeding cassava for apomixis. **Genetics and Molecular Research**, 4(4): 710-715. 2005.
- NASSAR, N. M. A. & COLLEVATTI, R. G. Molecular analysis of apomixis in cassava. **Genetics and Molecular Biology**, 5: 487-492. 2006.
- NASSAR, N. M. A. & DOREA, G. Protein contents of cassava cultivars and its hybrid with *Manihot* species. **Turrialba**, 32 (4): 429-432. 1982.
- NASSAR, N. M. A. & GRATTAPAGLIA, D. Variabilidade de clones de mandioca em relação a fertilidade e aspectos morfológicos. **Turrialba**, 36(4): 555-559. 1986.
- NASSAR, N. M. A. & GRATTAPAGLIA, D. Strict maternal inheritance of RAPD fingerprints confirms apomixis in cassava *Manihot esculenta* Crantz. **Canadian Journal of Plant Science**, 76: 379-382. 1996.
- NASSAR, N. M. A. & O'HAIR, S. K. Variation among cassava clones in relation to seed germination. **Indian Journal of Genetics**, 45(2): 394-398. 1985.
- NASSAR, N. M. A. & ORTIZ, R. Cassava improvement: challenges and impacts. **Journal of Agricultural Sciences**, 145(2):163-171. 2007.
- NASSAR, N. M. A. & ORTIZ, R. Cassava genetic resources: Manipulation for crop improvement. **Plant Breeding Review**, 31: 01-50. 2008.
- NASSAR, N. M. A. & SOUSA, M. V. Amino acid profile in cassava and its interspecific hybrid. **Genetics and Molecular Research**, 06: 192-197. 2007.
- NASSAR, N. M. A. & VIEIRA, N. J. R. S. C. Hibridação Interespecífica entre Mandioca e Espécies Silvestres de *Manihot*. **Ciência e Cultura**, 38 (6): 1051-1056. 1986.
- NASSAR, N. M. A.; NASSAR HALA, N. M.; CARVALHO, C. A.; VIEIRA, C. & SARAIVA, S. L. Cytogenetic behavior of interespecific hybrids of cassava

- and *M. neusana* Nassar. **Canadian Journal of Science**, 75: 675-678. 1995.
- NASSAR, N. M. A.; VIEIRA, C.; NASSAR, H. N. & CARVALHO, C. G. Induction of a productive aneuploid in cassava *Manihot esculenta* Crantz. **Brazilian Journal of Genetics**, 19: 173-175, 1996.
- NASSAR, N. M. A.; VIEIRA, C. & GRATTAPAGLIA, D. Molecular and embryonic evidence of apomixis in cassava interspecific hybrids (*Manihot* spp.). **Canadian Journal of Plant Science**, 78: 349-352. 1997.
- NASSAR, N. M. A.; VIEIRA, M. A.; VIEIRA, C. & GRATTAPAGLIA, D. Molecular and embryonic evidence of apomixis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, 102: 9-13. 1998.
- NASSAR, N. M. A.; SANTOS, E. & DAVID, S. Transference of Apomixis genes from *Manihot neusana* Nassar to Cassava. **Hereditas**, 132: 01-05. 2000.
- NASSAR, N. M. A.; KALKMANN, D. & COLLEVATTI, R. G. A further study of microsatellite on apomixis in cassava. **Hereditas**, 144: 01-04. 2007a.
- NASSAR, N. M. A.; VIZZOTTO, C. S.; SCHWARTZ, C. A. & PIRES JÚNIOR, O. R. Cassava diversity in Brazil: the case of carotenoid-rich landraces. **Genetics and Molecular Research**, 6(1): 116-121. 2007b.
- NASSAR, N. M. A.; HASHIMOTO, D. Y. C. & FERNANDES, S. D. Wild *Manihot* species: Botanical aspects, natural habitats, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research**, 07: 16-28. 2008a.
- NASSAR, N. M. A.; GRACIANO-RIBEIRO, D. & FERNANDES, S. D. Anatomical alterations due to polyploidy in cassava, *Manihot esculenta* Crantz. **Genetics and Molecular Research**, 07: 276-283. 2008b.
- NOGLER, G. A. Gametophytic apomixis. In: **Embryology of Angiosperms**. Berlkin: Springer-Verlag. 1984.
- NORIS, D. M. & KOGAN, M. Biochemical and morphological bases of resistance. In **Breeding plants resistance to insects**. Wiley Interscience Publication. 1980.
- OGBURIA, M. N. & ADACHI, T. An improved cleared-pistil technique for rapid *in toto* observation of embryo sac malformation in cassava (*Manihot*

- esculenta* Crantz). Cassava Biotechnology Network. **Second International Scientific Meeting**. Indonesia. 1994.
- OSUNTOKUN, B.O.; DUROWOJU, J.E.; MCFARLANE, H. & WILSON, J. Plasma amino-acids in the Nigerian nutritional ataxic neuropathy. **British Medical Journal**, 3: 647-649. 1968.
- OZIAS-AKINS, P. & DIJK, P. J. Mendelian genetics of apomixis in plants. **Annual Review of Genetics**, 41: 509-537. 2007.
- PAIVA, J. G. A.; FANK-DE-CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M. P. & GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral 500*: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica**, 20: 257- 264. 2006.
- PARROTT, W. A. & SMITH, R. R. Production of 2n pollen in red clover. **Crop Science**, 24: 469-472. 1982.
- PYKE, K. A.; JELLINGS, A. J. & LEECH, R. M. Variation in Mesophyll Cell Number and Size in Wheat Leaves. **Annals of Botany**, 65: 679-683. 1990.
- QUARIN, C. L.; ESPINOZA, F.; MARTINEZ, E. J.; PESSINO, S. C. & BOVO, O. A. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. **Sex Plant Reproduction**, 13:243–249. 2001.
- RAJI, A. A.; LADEINDE, T. A. O. & DIXON, A. G. O. Agronomic traits and tuber quality attributes of farmer grown cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Nigeria. **Journal of Tropical Agriculture**, 45: 9-13. 2007.
- RAMSEY, J. & SCHEMSKE, D. W. Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 29 : 467-501. 1998.
- RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems**. Chapman Hall, London. 1997.
- RICK, C. M. Natural variability in wild species of *Lycopersicon* and its bearing on tomato breeding. **Genetics Agronomy**, 30: 249-259. 1976.
- ROGERS, D. J. & APPAN, S. **Manihot, Manihotoides**. Flora Neotropica. New York, Hafner Press. (monograph n^o. 19). 1973.
- RUBULUZA, T.; NIKOLOVA, R. V.; SMITH, M. T. & HANNWEG, K. In vitro induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. **South African Journal of Botany**, 73: 259-261. 2007.

- RUDALL, P. J. Laticifers in Crotonoideae (Euphorbiaceae): Homology and Evolution. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 81(2): 270-282. 1994.
- SALA, C. A.; CAMADRO, E. L. SALABERRY, M. T. & MENDIBURU, A. O. Cytological mechanisms of $2n$ pollen formation and unilateral sexual polyploidization in *Lolium*. **Euphytica**, 43: 1-6. 1989.
- SASS, J.E. **Botanical Microtechnique**. The Iowa State College Press. Ames. 1951.
- SILVA, P. A. K. X. M.; CALLEGARI-JACQUES, S. & ZANETTINI, M. H. B. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (orchidaceae) by in vitro techniques. **Ciência Rural**, 30(1): 105-111. 2000.
- SILVA-LIMA, L. M.; ALQUINI, Y.; BRITO, C. J. F. & DESCHAMPS, F. C. Degradação ruminal dos tecidos vegetais e composição bromatológica de cultivares de *Axonopus scoparius* (Flüegge) Kuhl. e *Axonopus fissifolius* (Raddi) Kuhl. **Ciência Rural**, 31(3):509-515. 2001a.
- SILVA-LIMA, L. M.; ALQUINI, Y.; BRITO, C. J. F. & DESCHAMPS, F. C. Área de tecidos de folhas e caules de *Axonopus scoparius* (Flüegge) Kuhl. e *Axonopus fissifolius* (Raddi) Kuhl. **Ciência Rural**, 31(3):425-430. 2001b.
- SOHMER, S. H. Microsporogenesis in *Manihot esculenta*. **Cytologia**, 33: 97–99. 1968.
- SREERAMANAMUBRY, VV. Investigations on the nutritive value of tapioca (*Manihot utilissima*). **Indian Journal of Medical Research**, 33: 229-238. 1945.
- STEBBINS, G. L. Apomixis in the angiosperms. **Botanical Review**, 7: 507-542. 1941.
- STEBBINS, G. L. Types of polyploids: their classification and significance. **Advances in Genetics**, 1: 403-29. 1947.
- STEBBINS, G. L. **Rates of evolution in plants**. Princeton Press. 1949.
- STEBBINS, G. L. **Variation and evolution in plants**. Columbia University Press. New York. 1950.
- STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Addison-Wesley, London. 1971.

- STEBBINS, G. L. Polyploidy, hybridization and the invasion of new habitats. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 72, 824-832. 1985.
- STOREY, H. H. & NICHOLS, F. W. Studies of mosaic of cassava. **Annals of Applied Biology**, 25: 790-806. 1938.
- STRASSBURGER, E. **Tratado de Botânica**. Manuel Marín. Barcelona. 1943.
- SUGIYAMA, S. Polyploidy and Cellular Mechanisms Changing Leaf Size: Comparison of Diploid and Autotetraploid Populations in Two Species of *Lolium*. **Annals of Botany**, 96: 931-938. 2005.
- SWAMINATHAN, N. S.; MAGOON, M. L. & EARA, K. L. A. Simple propionocarmine PMC smear method for plants with small chromosomes. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, 14: 87-88. 1954.
- SWANSON, C. P.; MERZ, T. & YOUNG, W. J. **Citogenética**. Universidade de São Paulo. 1969.
- THOMAS, M. & HILL, GEO. R. The continuous measurement of photosynthesis, respiration, and transpiration of alfalfa and wheat growing under field conditions. **Plant Physiology**, 12: 285-307. 1937.
- UDALL, J. A. & WENDEL, J. F. Polyploidy and crop improvement. **Crop Science**, 46(1): 3-14. 2006.
- VALLE, C. B. & SAVIDAN, Y. H. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Milles, J. W., Mass, B. L., Valle, C. B., (eds). **Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement**. Cali/Brasília. 1996.
- VANNUCCI, A. L. Anatomia comparada de duas espécies nativas de *Manihot* Mill (Euphorbiaceae). São Paulo: Dissertação de mestrado. 1982.
- VANNUCCI, A. L. Anatomia foliar comparada de duas espécies nativas de *Manihot* Mill (Euphorbiaceae). In: **Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Botânica do Brasil**, 2: 819-836. 1985.
- VIÉGAS, A.P. Anatomia da parte vegetativa da mandioca. **Boletim Técnico Instituto Agrônomo de Campinas**, 74: 5-30. 1940.
- VORSA, N. & BINGHAM, E. T. Cytology of 2n pollen formation in diploid alfafa, *Medicago sativo*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, 21: 525-530. 1979.

- VRIES, C. A.; FERWEDS, J. D. & FLACH, M. Choice of food crops in relation to actual and potencial production in tropics. **Netherland Journal of Agricultural Science**, 15: 241-246. 1967.
- WEBSTER, G. Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae. **Taxon**, 24: 593-601. 1975.
- WEBSTER, G. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 81: 33-144. 1994.
- 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**, 57: 1668-1672. 1979.

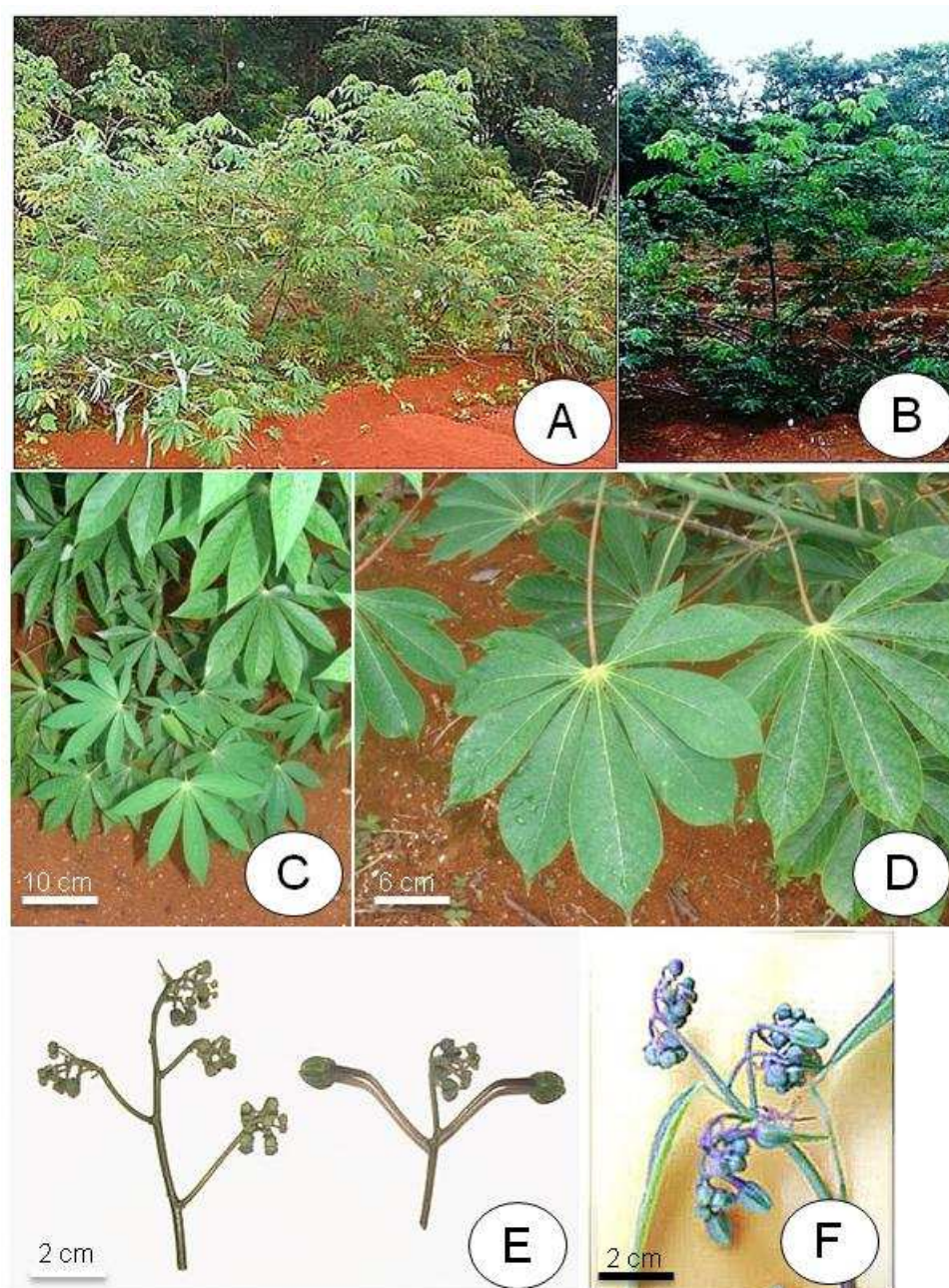


Fig. 3. Aspectos morfológicos dos híbridos entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **A.** Aspecto geral de ICB 300 diploide, planta com 2 m, estabelecida na Estação Experimental de Biologia da UnB. **B.** Aspecto geral de ICB 300 tetraploide, planta com 2,2 m, estabelecida na Estação Experimental de Biologia da UnB. **C.** Folhas de ICB 300 diploide em detalhe. **D.** Folhas de ICB 300 tetraploide em detalhe. **E.** Inflorescência de ICB 300 diploide. **F.** Inflorescência de ICB 300 tetraploide.

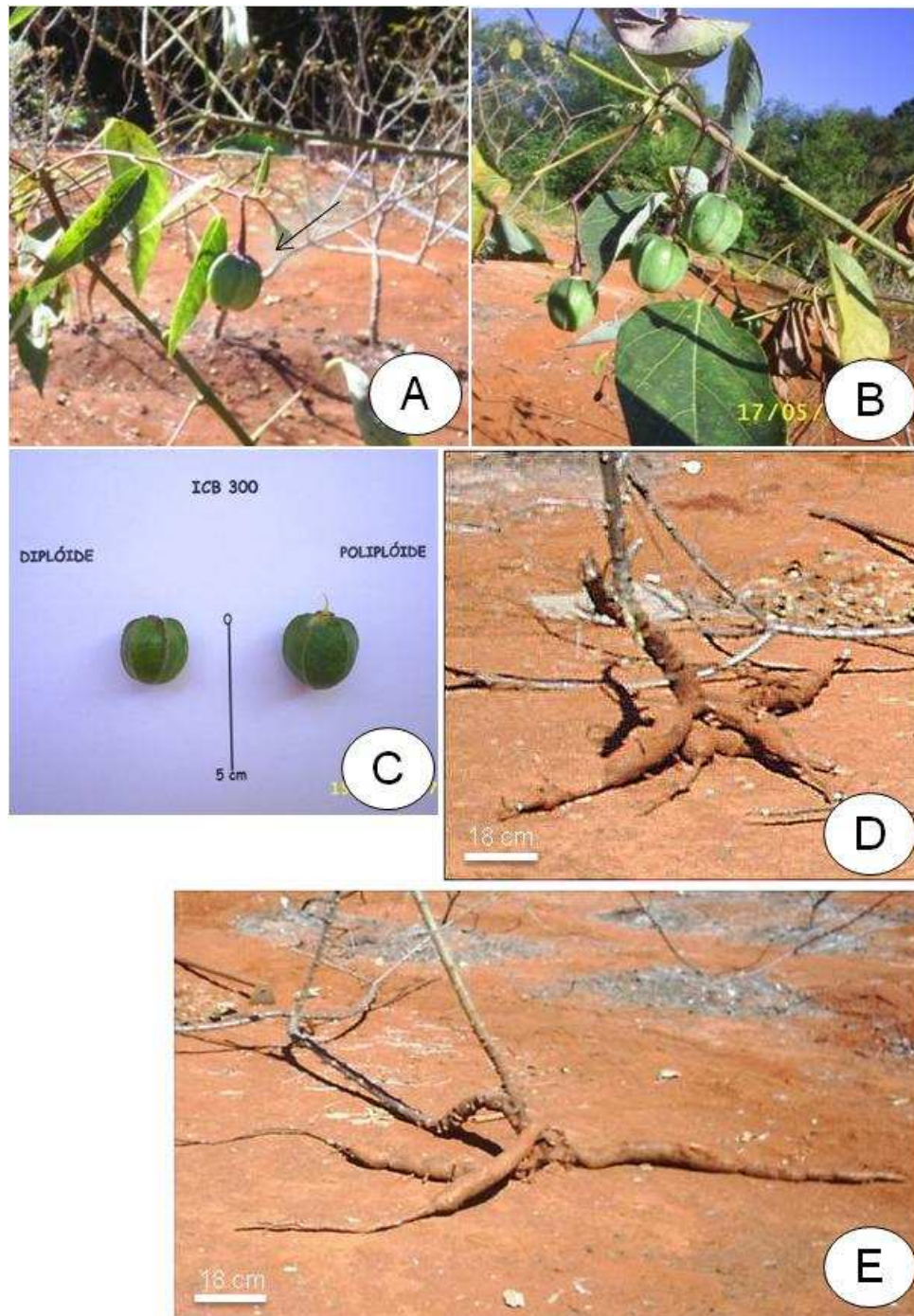


Fig 4. Aspectos morfológicos dos híbridos entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **A.** Fruto de ICB 300 diploide. **B.** Fruto de ICB 300 tetraploide. **C.** Diferenças de dimensões dos frutos dos híbridos. **D.** Raízes do híbrido diploide. **E.** Raízes do híbrido tetraploide, destacando-se o seu comprimento aumentado em relação ao tipo diploide.

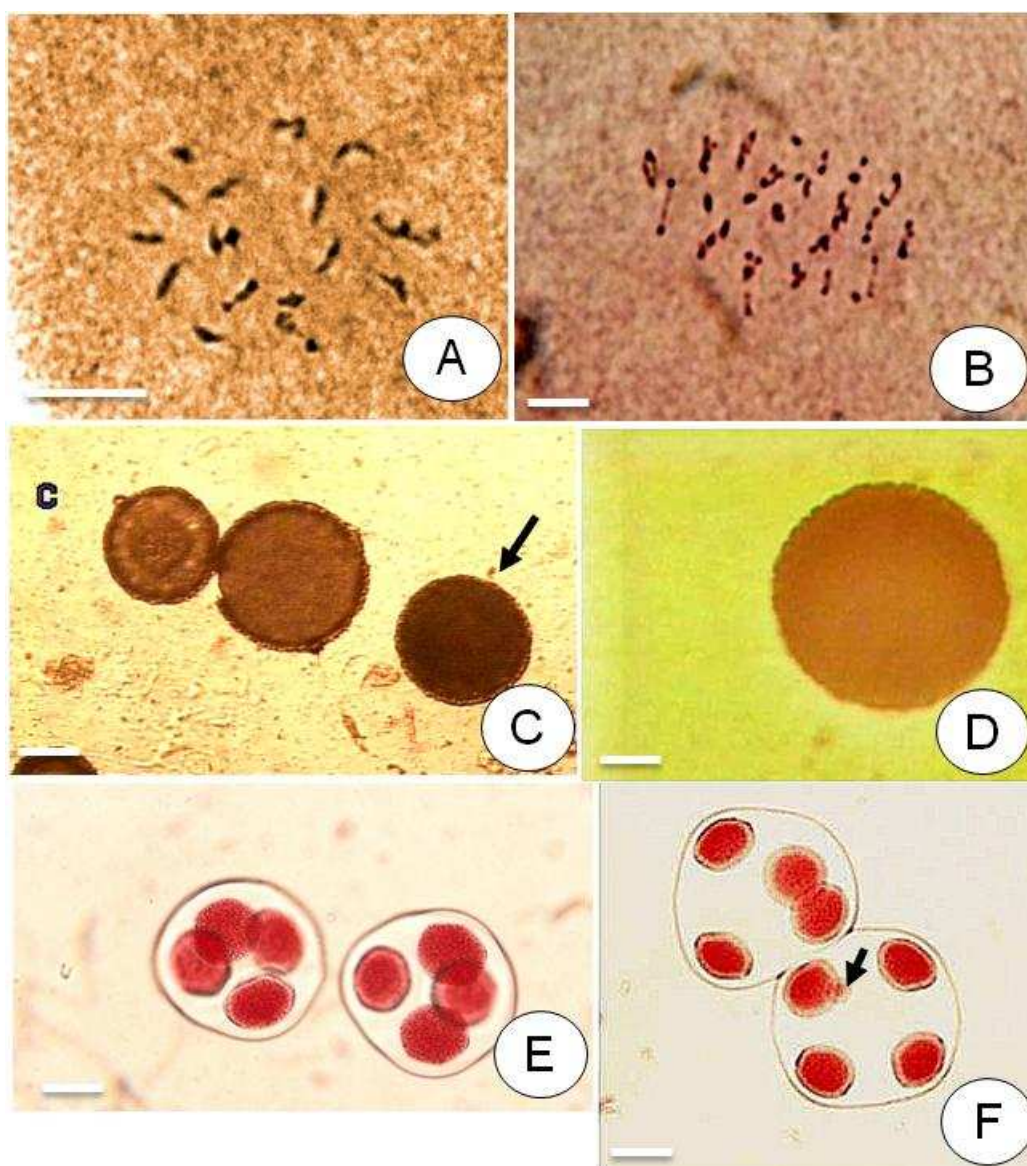


Fig. 5. **A.** Configuração cromossômica do híbrido diploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha* revelando 36 cromossomos em associações de 18 bivalentes. **B.** Configuração cromossômica do híbrido tetraploide revelando 72 cromossomos, sendo 28 bivalentes e 4 quadrivalentes. **C.** Grãos de pólen no híbrido diploide (viável-seta). **D.** Grão de pólen viável no híbrido tetraploide. **E.** Tétrades normais no híbrido diploide. **F.** Tétrade com micronúcleo (seta) no híbrido tetraploide. Barra = 100 μ m.

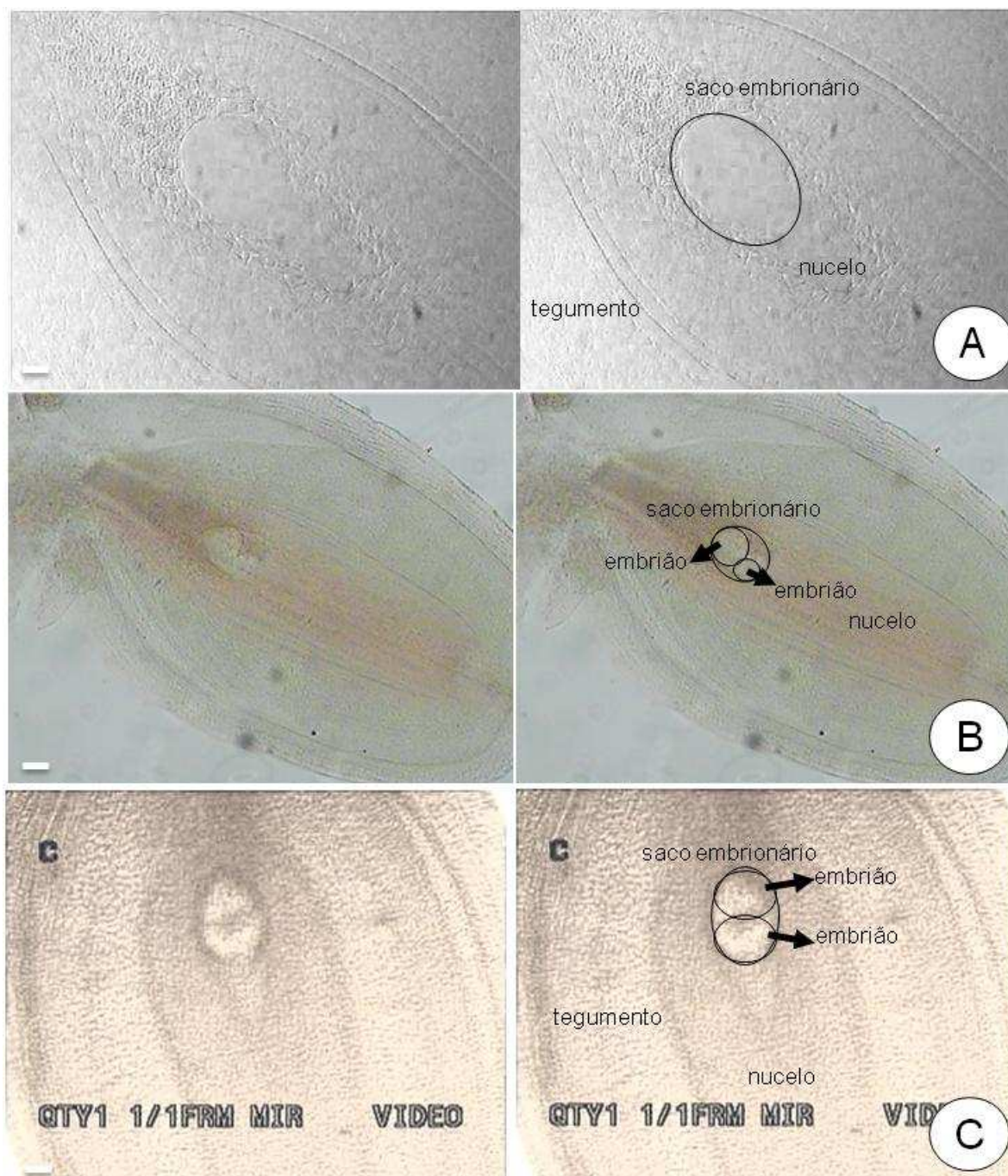


Fig. 6. Estrutura do óvulo dos híbridos diploide e tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **A.** Óvulo não-apomítico. **B.** Óvulo apomítico revelando dois embriões no híbrido diploide. **C.** Óvulo apomítico com dois embriões no híbrido tetraploide. Barra = 100 μ m.

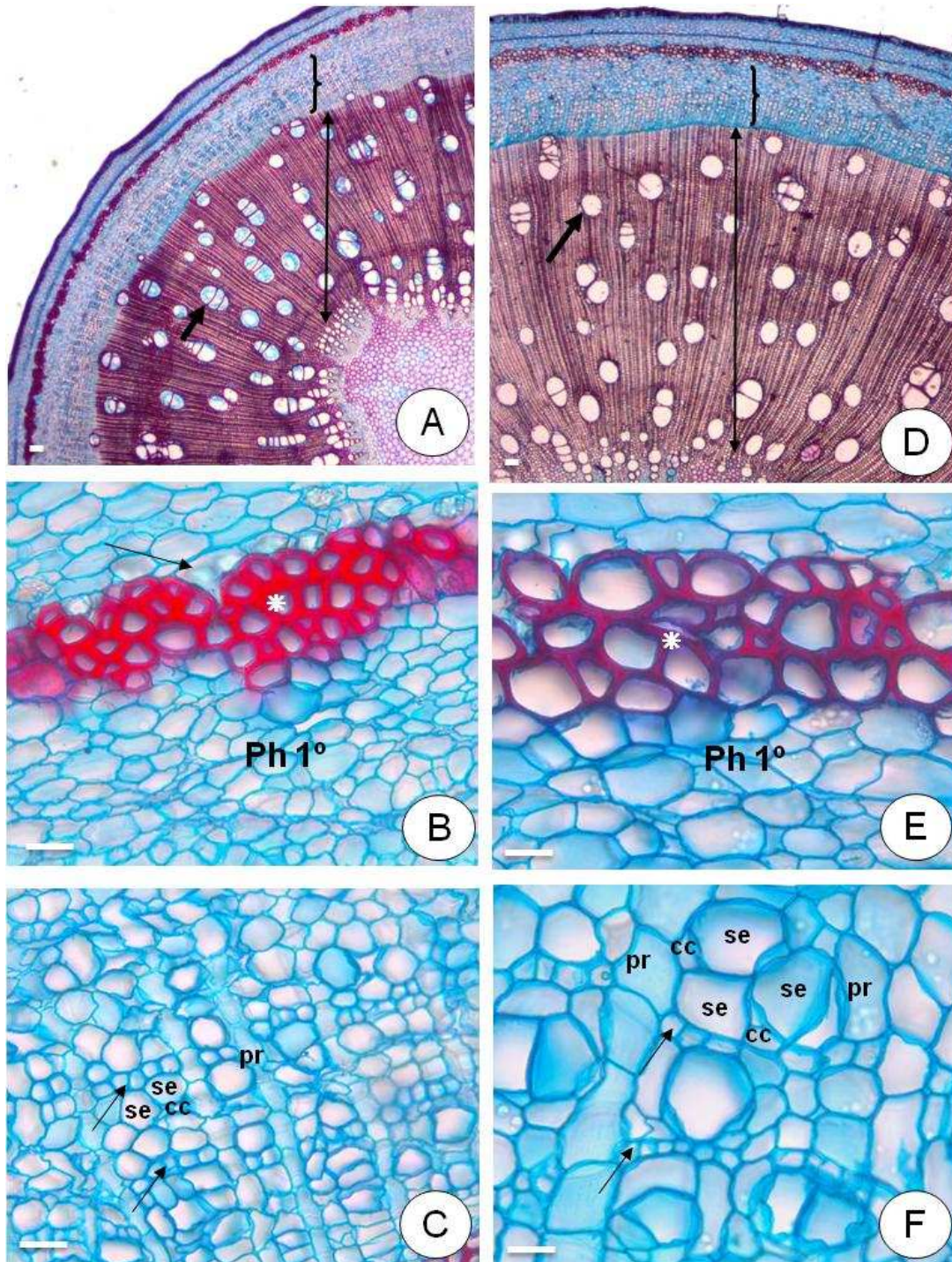


Fig. 7. A-C. Cortes transversais do caule do híbrido diploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. D-E. Cortes transversais do caule do híbrido tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. A. Visão geral do caule ressaltando-se o diâmetro do xilema (seta dupla) e elementos de vaso com tiloses (seta menor). B. Detalhe do córtex com bainha amilífera, fibras pericíclicas (*) e Floema primário (Ph 1°) com laticíferos. C. Detalhe do floema secundário com laticíferos (setas). D. Visão geral do caule com elementos de vaso com raras tiloses e maior número de camadas no córtex. E. Detalhe do Córtex com bainha amilífera, fibras pericíclicas (*) e Floema primário (Ph) com laticíferos. F. Detalhe do floema secundário com laticíferos. cc= célula companheira, se= elemento de tubo crivado, pr= parênquima radial. Barra = 100 µm.

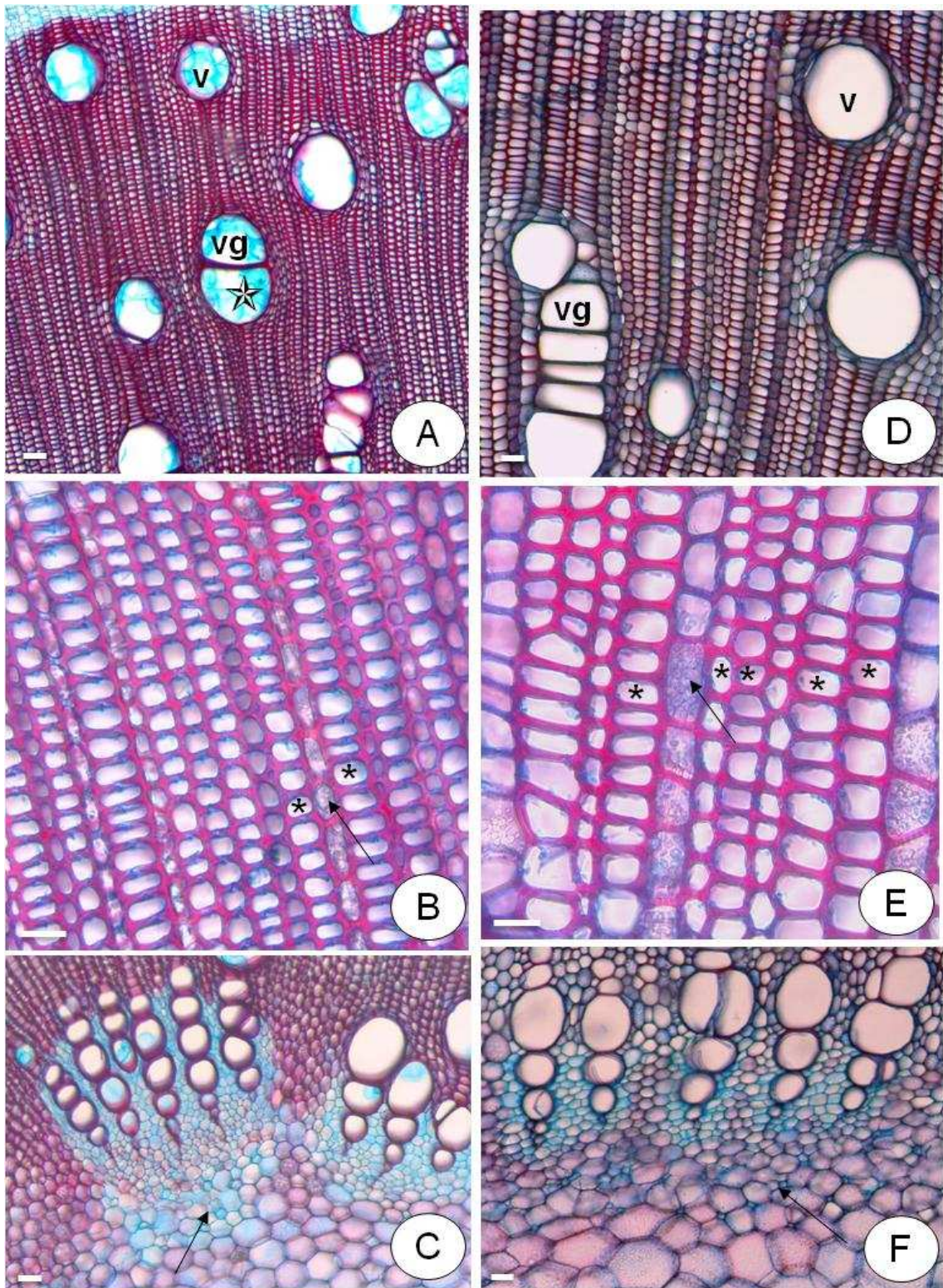


Fig. 8. A-C. Corte transversal do caule do híbrido diploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. D-E. Corte transversal do caule do híbrido tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **A.** Detalhe do xilema secundário evidenciando os elementos de vaso solitários (v) e em grupo (vg) apresentando no seu interior tilose (*). **B.** Xilema secundário com fibras (*) e amido (seta). **C.** Detalhe do xilema 1º e floema 1º interno com laticíferos (seta). **D.** Detalhe do xilema secundário evidenciando maior número de elementos de vaso sem tilose, notam-se fibras com paredes finas. **E.** Xilema secundário com fibras (*) e amido em abundância (seta). **F.** Detalhe do xilema primário, floema primário interno e laticíferos (seta). Barra = 100 µm.

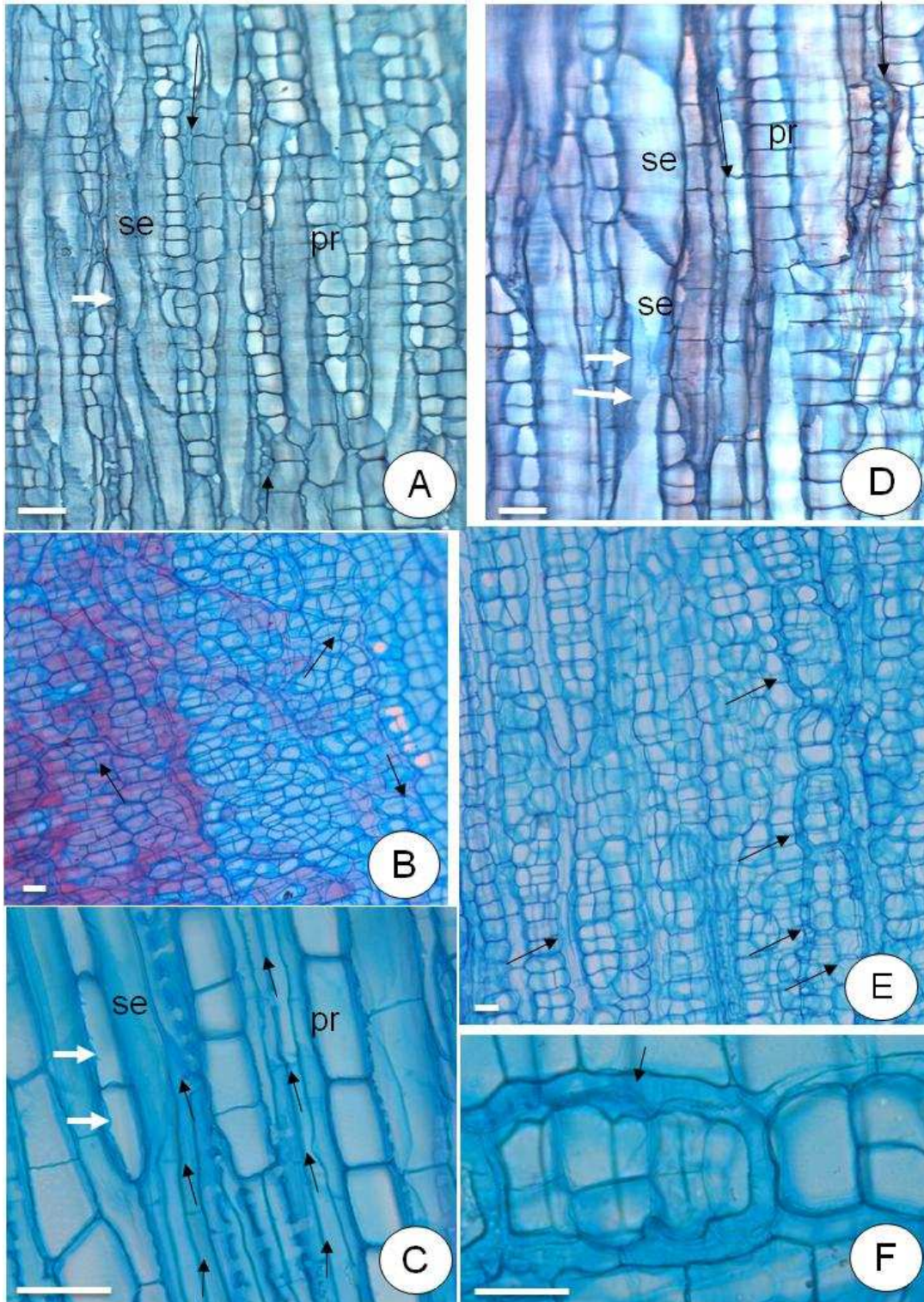


Fig. 9. Cortes longitudinais evidenciando a região de floema. **A-C.** Híbrido diploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **D-F.** Híbrido tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **A.** Floema secundário com parênquima radial (pr), elementos de tubo crivado (se), células companheiras (seta branca) e laticíferos (seta preta). **B.** Floema secundário com laticíferos. **C.** Laticíferos no floema primário. **D.** Floema secundário com parênquima radial (pr), elementos de tubo crivado (se), células companheiras (seta branca) e laticíferos (seta preta). **E.** Laticíferos articulados e ramificados. **F.** Laticíferos no tecido floemático primário. Barra = 100 µm.

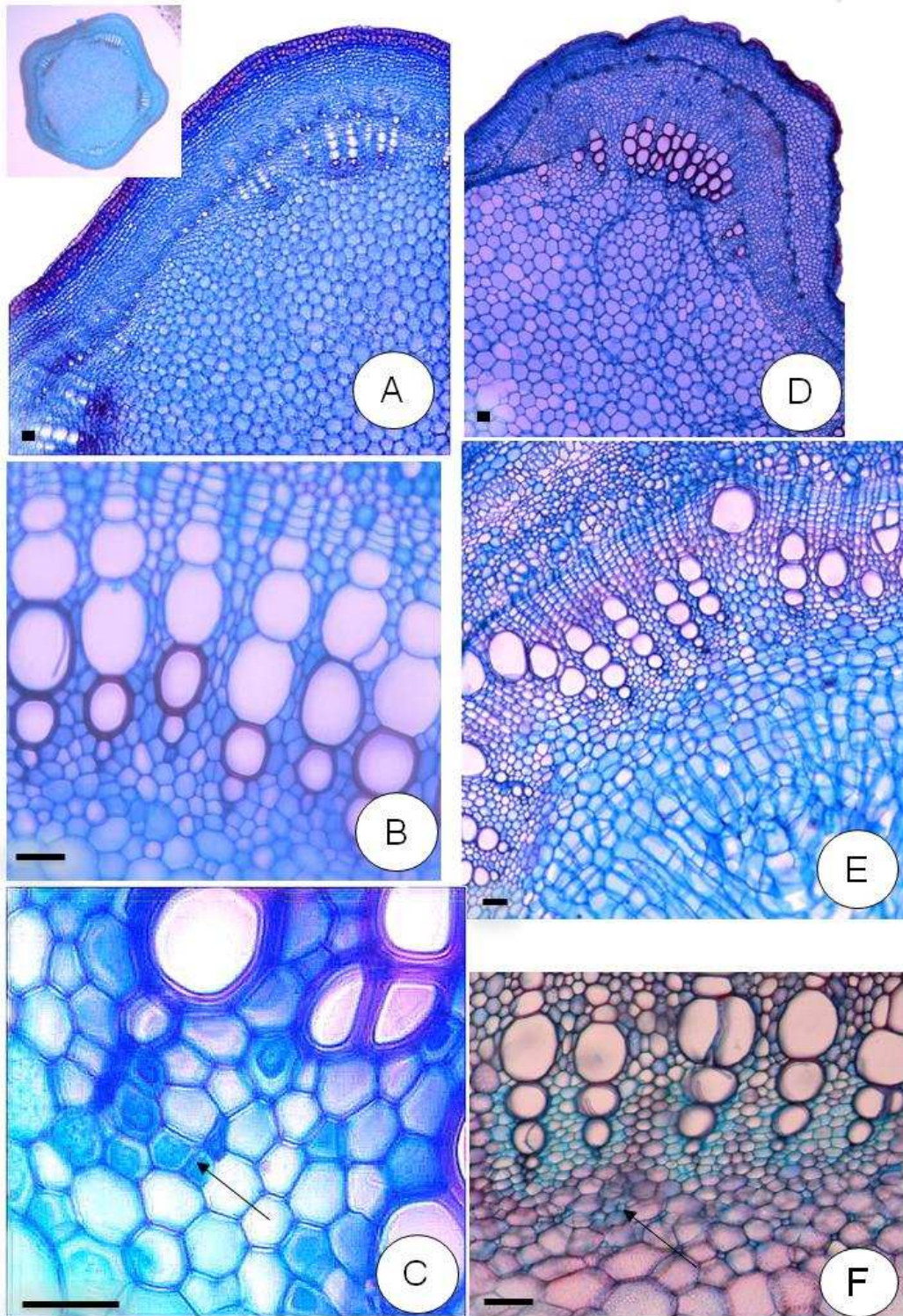


Fig. 10. Cortes transversais evidenciando o sistema vascular bicolateral. **A-C.** Híbrido diploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **D-F.** Híbrido tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **A.** Canto esquerdo - Visão geral da estrutura secundária; observam-se cinco feixes vasculares dispostos nos cantos. Detalhe da região cortical, cilindro vascular e medula. **B.** Câmbio fascicular, xilema primário e floema primário interno. **C.** Detalhe das placas crivadas nos elementos de tubo crivado do floema primário interno. **D.** Estrutura secundária em visão geral. **E.** Detalhe do crescimento secundário, com câmbio vascular formando xilema e floema secundário e parênquima medular se dividindo para originar células poligonais mais longas e estreitas. **F.** Detalhe do xilema primário e floema primário interno (seta) e laticíferos. Barra= 100 μ m.

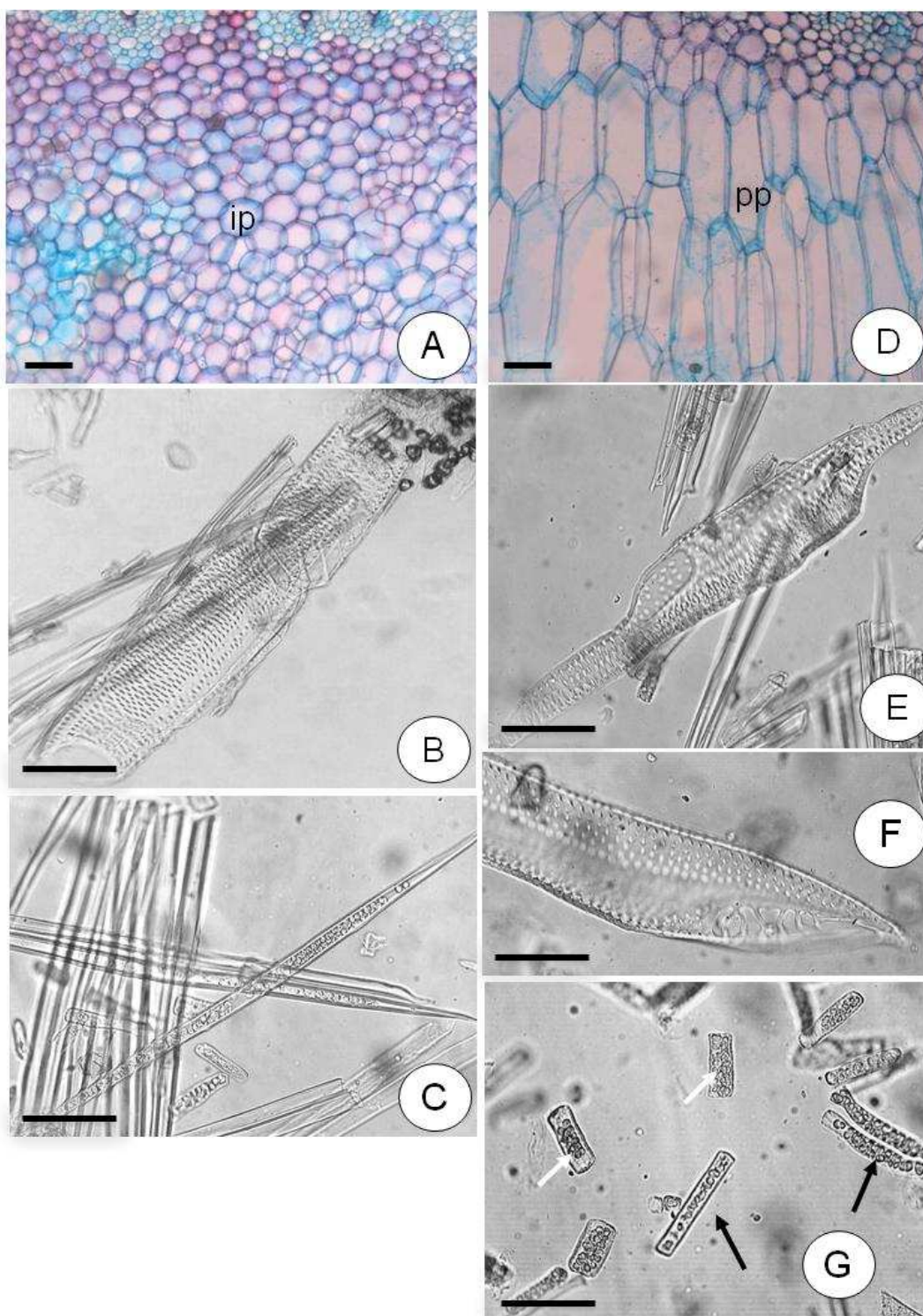


Fig. 11. **A, B, C e G.** Híbrido diploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **D, E e F.** Híbrido tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **A.** Detalhe do formato e tamanho das células poligonais isodiamétricas (ip) da medula **B.** Elementos de vaso reticulados de tamanho médio e placa de perfuração simples e reta. **C.** Fibras libriformes com amido. **D.** Detalhe do formato e tamanho das células poligonais alongadas(pp) da medula. **E.** Elementos de vaso pequenos do tipo reticulado com placa de perfuração simples oblíqua e apêndices em ambas as extremidades. **F.** Elementos de vaso grandes reticulados com placa de perfuração simples e extremidade oblíqua. **G.** Parênquima radial (seta preta) e axial (seta branca) com conteúdo de amido. Barra = 100 μ m.

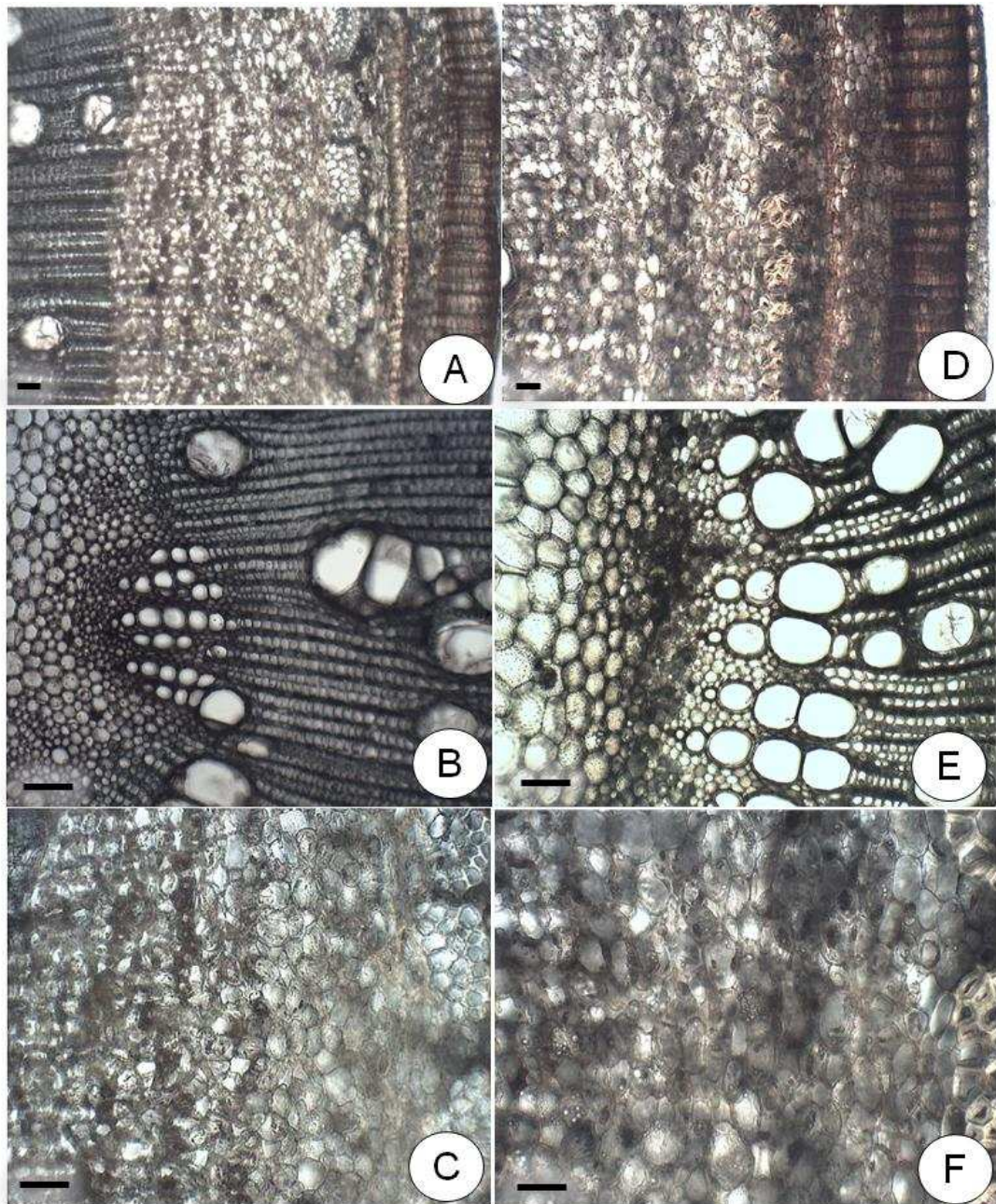


Fig. 12. Cortes transversais dos híbridos entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. Controles para testes histoquímicos. **A-C.** Híbrido diploide. **D-F.** Híbrido tetraploide. Barra = 100 μ m.

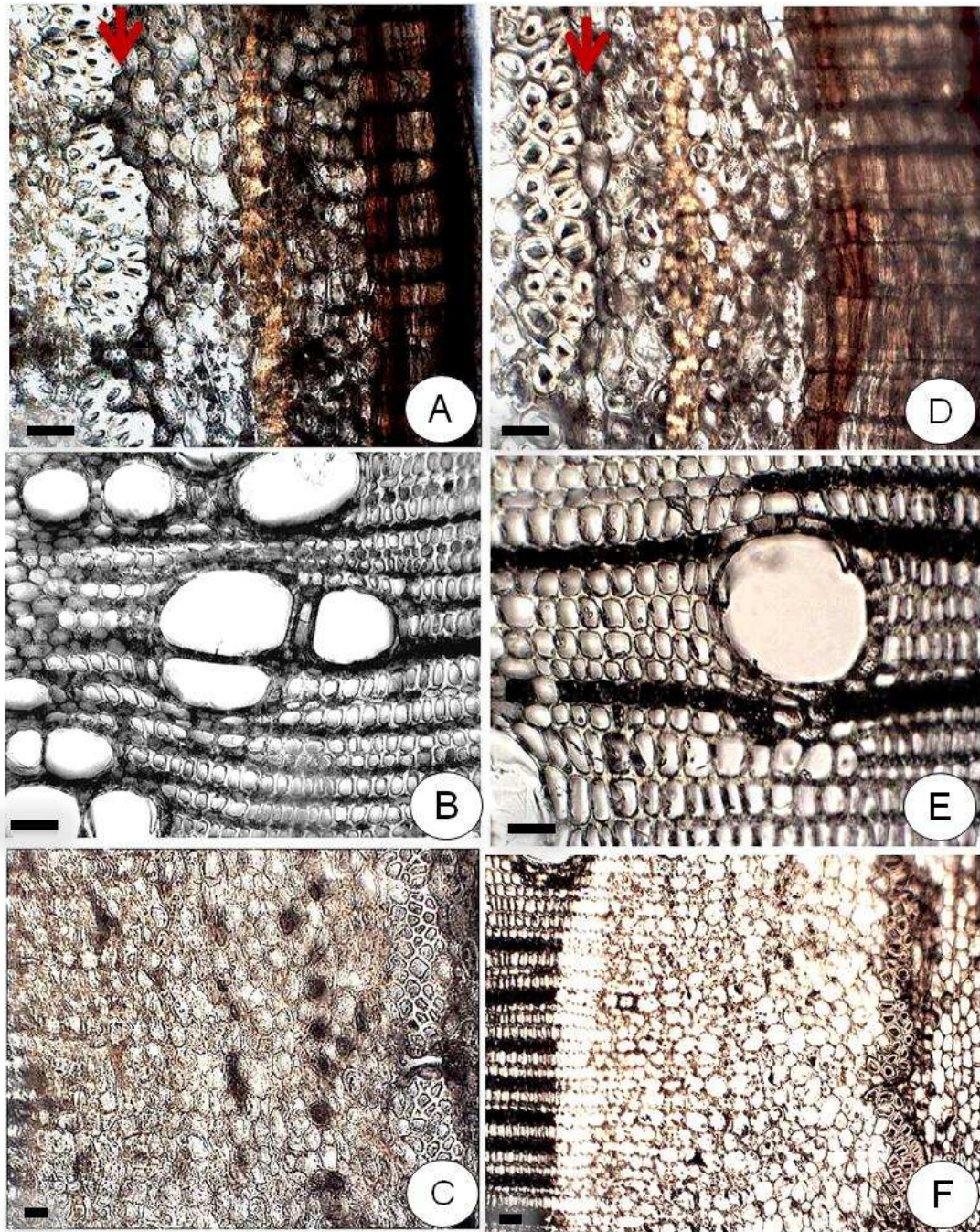


Fig 13. Teste histoquímico com lugol para detecção de grãos de amido. **A-C.** Híbrido diploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **D-F.** Híbrido tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **A.** Amido em abundância na bainha amilífera (seta). **B.** Amido no xilema secundário. **C.** Amido em menor abundância no floema. **D.** Amido em menor abundância na bainha amilífera (seta). **E.** Presença de amido no xilema secundário. **F.** Presença de grãos de amido no floema. Barra = 100 μ m.

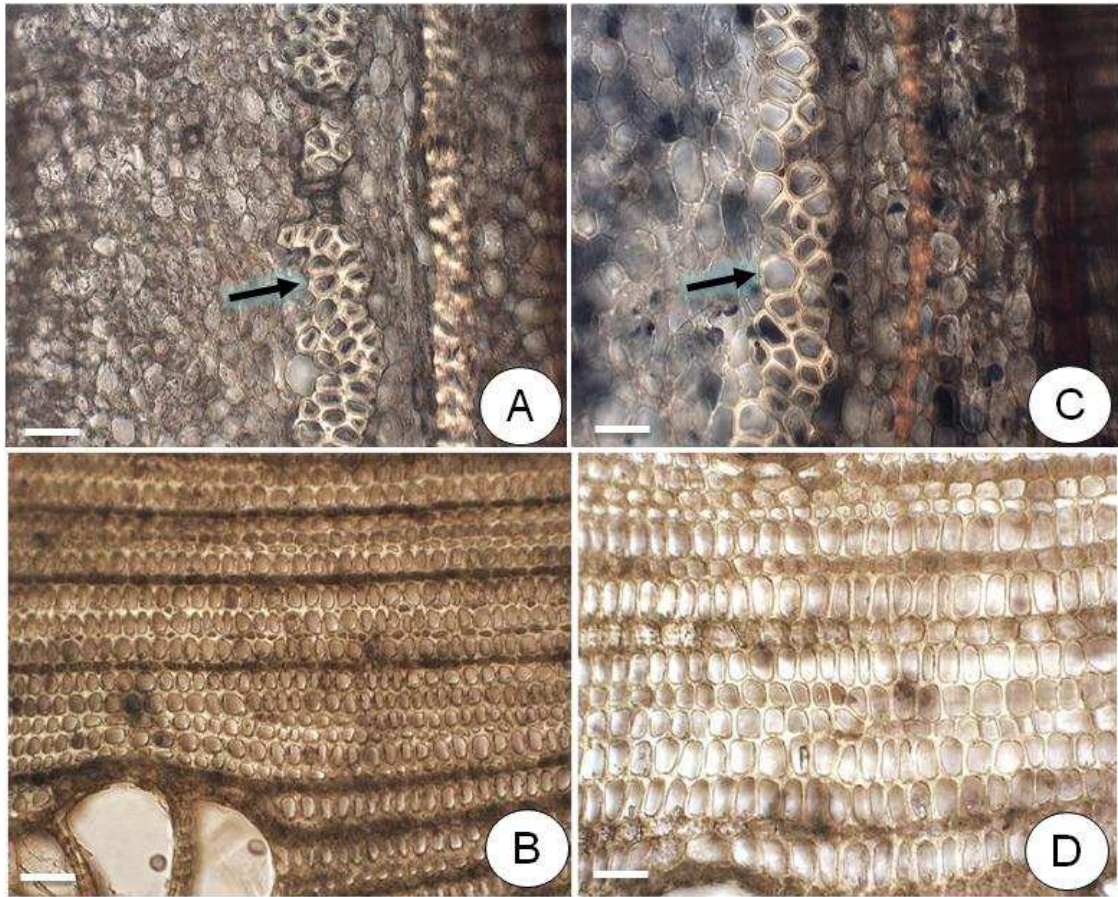


Fig. 14. Teste histoquímico com cloreto de zinco iodado para detecção de lignina. **A e B.** Híbrido diploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **C e D.** Híbrido tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **A.** Fibras pericíclicas com paredes espessadas (seta). **B.** Xilema secundário com presença de lignina. **C.** Fibras pericíclicas com paredes delgadas (seta). **D.** Xilema secundário em menor abundância de lignina que no híbrido diploide. Barra = 100 μ m.

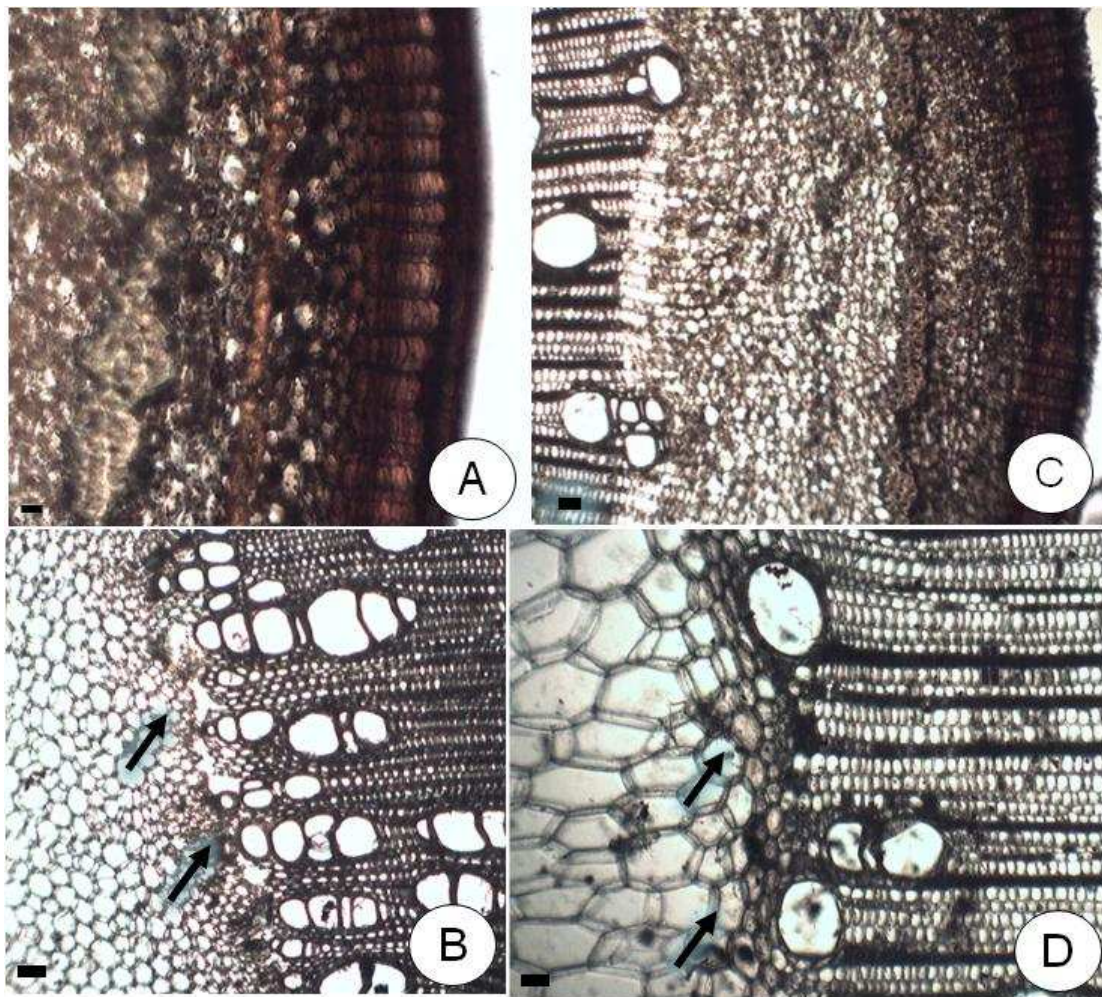


Fig. 15. **A e C.** Teste histoquímico com Sudan III para detecção de suberina. **B e D.** Teste histoquímico com Sudan IV para detecção de látex. **A.** Híbrido diploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **B.** Híbrido diploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. Látex no floema interno (setas). **C.** Híbrido tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. **D.** Híbrido tetraploide entre *M. esculenta* x *M. oligantha*. Látex no floema interno (setas). Barra = 100 μ m.