

11133  
CENARGEN  
1998  
ex. 2  
FL-11133a

**Boletim de Pesquisa**

ISSN 0102-0129

Número, 2

Setembro, 1998

# Análise do Gametófito Feminino de *Brachiaria brizantha* Através de Secções de Ovários Incluídos em Resina Spurr

**Embrapa**

Análise do gametófito  
1998 FL-11133a

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Instituto de Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Agricultura e do Abastecimento



39566-2

**República Federativa do Brasil**  
**Presidente**  
*Fernando Henrique Cardoso*

**Ministério da Agricultura e do Abastecimento**  
**Ministro**  
*Francisco Sérgio Turra*

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**  
**Embrapa**  
**Diretor - Presidente**  
*Alberto Duque Portugal*

**Diretores - Executivos**  
*Elza Angela Battaglia Brito da Cunha*  
*José Roberto Rodrigues Peres*  
*Dante Daniel Giacomelli Scolari*

**Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia**  
**Cenargen**

**Chefe Geral**  
*Afonso Celso Candeira Valois*

**Chefe Adjunto Técnico de Biotecnologia**  
*Damara de Castro Monte*

**Chefe Adjunto Técnico de Recursos Genéticos**  
*Edna Stella Britto Garcia Costa Manso*

**Chefe Adjunto Administrativo**  
*Kazuyoshi Ofugi*

**Análise do Gametófito  
Feminino de *Brachiaria brizantha*  
Através de Secções de Ovários  
Incluídos em Resina Spurr**

*Ana Maria Canut Cunha  
Vera Tavares Campos Carneiro  
Ana Cláudia Guerra Araújo*

*Brasília, DF  
1998*

Embrapa - Cenargen. Boletim de Pesquisa, nº 2

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

SAIN Parque Rural – Final Av. W/5 Norte – Brasília, DF

CEP: 70770-900 Caixa Postal: 02372

PABX: (061) 340-3600 Tel: (061) 340-3500

Fax: (061) 340-3624 Telex: (061) 1622

Comitê de Publicações

Presidente: Edna S. B. G. Costa Manso

Secretária Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

Dameres de Castro Monte

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Marcos Rodrigues de Faria

Maria Fernanda Diniz Ávidos

Maria Regina J. Soares

Marisa de Goes

Miguel Borges

Suplentes: Antônio Emídio Dias F. da Silva

Rui A. Mendes

Editora Chefe : Marisa de Goes

Tratamento Editorial e

Normalização Bibliográfica: Maria Regina Jorge Soares

Miraci de Arruda Camara Pontual

Editoração Eletrônica: Márcio Maeda Fukase

Tiragem: 500 exemplares.

CUNHA, A. M. C.; CARNEIRO, V. T. C.; ARAÚJO, A. C. G. Análise do gametófito feminino de *Brachiaria brizantha* através de secções de ovários incluídos em resina Spurr. Brasília: Embrapa - Cenargen, 1998. 27 p. (Embrapa - Cenargen. Boletim de Pesquisa, 2).

1. *Brachiaria brizantha* - Morfologia. I. Título. II. Série.

CDD 584.9

© Embrapa – 1998

## S U M Á R I O

Apresentação	5
Resumo	7
Abstract	9
1. Introdução	10
2. Material e Métodos	12
3. Resultados	14
4. Discussão	16
5. Referências bibliográficas	20
6. Anexos	23

## **A P R E S E N T A Ç Ã O**

A biodiversidade e biomassa são pontos fortes do Brasil que representam uma grande vantagem comparativa no âmbito internacional, acrescidos da existência de extensas áreas agricultáveis tendo em vista as cadeias produtivas do agronegócio.

A pesquisa dos componentes da agrobiodiversidade com o emprego das biotecnologias disponíveis em exploração da variabilidade genética existente em bancos de germoplasma e em outras situações, possibilita aos produtores a exploração de genótipos capazes de contribuir para o aumento da produção e produtividade da agropecuária de maneira sustentável.

Uma possibilidade é o uso da apomixia que é o fenômeno da reprodução em que ocorre a formação assexuada de sementes, de grande importância para a exploração de gramíneas forrageiras, principalmente para o uso do vigor do híbrido com vantagens, por possibilitar a clonagem de sementes e conseqüentemente geração de indivíduos com a mesma identidade genética das plantas de origem.

Devido a importância da reprodução apomítica muitos estudos precisam ser desenvolvidos para o incremento da quantidade dos conhecimentos disponíveis, para facilitar o seu emprego.

Assim, é com enorme satisfação que a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia coloca este Boletim de Pesquisa à disposição da comunidade técnico-científica, fruto da perseverança, empenho e dedicação das nobres autoras, que acrescenta formidáveis informações sobre o fenômeno da apomixia.

**Afonso Celso Candeira Valois**

**Chefe Geral**

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

**ANÁLISE DO GAMETÓFITO FEMININO DE *Brachiaria  
brizantha* ATRAVÉS DE SECÇÕES DE OVÁRIOS  
INCLUÍDOS EM RESINA SPURR**

Ana Maria Canut Cunha<sup>1</sup>  
Vera Tavares Campos Carneiro<sup>2</sup>  
Ana Cláudia Guerra Araújo<sup>3</sup>

**RESUMO**

A apomixia, reprodução assexuada de plantas através de sementes, pode ser estudada pela comparação das características do modo de reprodução das plantas apomíticas com aquelas das plantas com modo sexual de reprodução. Através de informações obtidas em nível celular sobre o desenvolvimento e a organização do gametófito feminino da gramínea *Brachiaria brizantha*, pretende-se contribuir ao maior conhecimento sobre a reprodução apomítica. Para o estudo do gametófito feminino foram realizadas análises sob microscopia de luz, com o objetivo de compreender melhor a organização dos sacos embrionários meioticamente reduzidos, presentes em plantas com modo de reprodução sexual.

Termos para indexação:

*Brachiaria brizantha*, morfologia, gametófito feminino, ovário.

<sup>1</sup> Bolsista CNPq, estudante de graduação, Eng. Agrônômica, UnB.

<sup>2</sup> Eng<sup>o</sup>. Agr<sup>o</sup>., PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Cortes semifinos de ovários, com aproximadamente 120 nm de espessura, incluídos em resina Spurr, foram seccionados seriadamente, coletados, montados em lâminas e corados com azul de toluidina, para análise sob microscopia de luz. Esta resina permite a obtenção de secções mais delgadas do que as obtidas com parafina (600 a 1200 nm), proporcionando, assim, uma maior quantidade de detalhes e definição das análises.

**ANALYSIS OF *Brachiaria brizantha* FEMALE  
GAMETOPHYTE USING SECTIONING OF SPURR  
INCLUDED OVARIES**

**ABSTRACT**

Apomixis, the asexual mode of plant reproduction throughout seeds can be studied by comparative morphological analysis between ovules from apomictic and sexual plants. Female gametophyte organization and development data at cellular level can contribute to a better understanding of apomixis. Optical analysis of meiotically reduced embryo sacs of sexual plants were done using ovaries embedded in Spurr resin. Serial semi-thin sections with approximately 120 nm were obtained and stained with toluidine blue. Spurr resin enables thinner sectioning than when samples are embedded in paraffin or plastic resins, resulting in more detailed and defined analysis.

**INDEX TERMS:**

*Brachiaria brizantha*, morphology, ovary, female gametophyte.

## 1. INTRODUÇÃO

A apomixia é um modo de reprodução assexuado de plantas através de sementes. O embrião pode se desenvolver diretamente de células do tegumento ou nucelo ovariano (embrionia adventícia), a partir de célula originada de meiose parcial ou mitose da megáspora (diplosporia), ou ainda de um saco embrionário não reduzido, derivado de uma célula do nucelo (aposporia), originando o embrião por partenogenia. Conseqüentemente, a apomixia é uma forma de originar sementes que resultam em plantas geneticamente iguais à planta-mãe, mantendo o genótipo ao longo das gerações e sendo, portanto, um processo de clonagem por sementes (Hanna & Bashaw, 1981).

Os fenômenos que melhor distinguem a reprodução apomítica da sexual são: 1. ausência do processo meiótico, não ocorrendo a redução cromossômica e a conseqüente formação de sacos embrionários não reduzidos; 2. ausência de fecundação para a formação do embrião (Nomura & Komamine, 1985 e Zimmerman, 1993).

A apomixia em algumas gramíneas foi demonstrada como sendo um caráter geneticamente dominante através de testes de progênie (Savidan & Dujardin, 1992) e na *Brachiaria* está associada a um único *locus* (Valle et al., 1994).

O objetivo de melhor compreender o mecanismo da apomixia é contribuir para o desenvolvimento de tecnologias de transferência deste caráter para a fixação de genótipos recombinantes com interesse agrônômico.

Neste estudo sobre apomixia está sendo utilizado como modelo a *Brachiaria*, gênero no qual foram identificadas espécies apresentando reprodução sexual e apomítica. *Brachiaria* é uma forrageira nativa das savanas tropicais da África, introduzida na América do Sul no século XVIII-XIX e no Brasil, em 1952 (Serrão & Simão Neto, 1971). O gênero *Brachiaria* apresenta diversas espécies com importância agrônômica em sistemas de pastagens nativos ou cultivados em toda a região tropical, onde as principais espécies são *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziensis*. No Brasil, cerca de 40 milhões de hectares estão cultivados com *Brachiaria*, principalmente no cerrado (Valle & Miles, 1992).

Entre as diversas espécies identificadas e caracterizadas no CNPQC (Valle et al, 1994), *B. brizantha* foi escolhida para diferentes trabalhos desenvolvidos no Cenargen. Os acessos utilizados são o BRA 000591, tetraplóide ( $2n = 4x = 36$ ), apresentando reprodução preferencialmente apomítica e, para este trabalho, o acesso BRA 002747, diplóide ( $2n = 2x = 18$ ), apresentando reprodução sexual (Valle & Glienke, 1991). Nas plantas com reprodução sexual, o embrião é resultante de um gametófito reduzido, que tem origem de uma megáspora, situada na região micropilar do óvulo. Após meiose, dá origem a quatro megásporas reduzidas das quais três se degeneram enquanto a chalazal se desenvolve, dando origem ao saco embrionário meiótico. A forma de organização do saco embrionário meiótico em *B. brizantha* foi descrito como *Polygonum*, que apresenta, inicialmente, sete células e oito núcleos.

Na região micropilar do gametófito feminino estão presentes a célula-ovo, as sinérgidas e a célula central,

enquanto que, na região chalazal, encontram-se três células antípodas.

Nesta espécie, a apomixia é do tipo apospórica e o modelo de organização do saco embrionário é similar ao encontrado em *Panicum*, apresentando quatro células: uma célula central, duas sinérgidas e uma célula-ovo (Valle & Miles, 1992). O embrião é resultante da partenogênese do gametófito não reduzido ( $2n$ ), originado de células somáticas do nucelo, denominadas iniciais apospóricas.

Através de análise de secções de ovários incluídos em resina Spurr, pretende-se obter detalhes sobre a organização do gametófito sexual maduro do genótipo BRA 002747 de *B. brizantha*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Ovários de plantas do acesso sexual de *B. brizantha*, BRA 002747 foram coletados de plantas mantidas no campo da Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Vinte ovários de flores coletadas entre dois e três dias antes da antese, foram obtidos com o auxílio de um microscópio estereoscópio, pinça e estilete.

As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4%, diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, durante duas horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, os ovários foram lavados três vezes por dez minutos em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2. Como os ovários eram pequenos e transparentes, foram processados dentro de tubos de microcentrífuga e antes de cada etapa, microcentrifugados. Após retirado o excesso de fixador, a

pós-fixação foi realizada utilizando tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2 em uma solução 1:1, por vinte minutos, em temperatura ambiente e no escuro.

Após esta etapa, o material foi novamente lavado, três vezes por dez minutos em tampão e duas vezes por cinco minutos, em água destilada. Contrastação *in bloc*, com uma solução aquosa de acetato de uranila a 0,5%, foi realizada por doze horas a 4°C. A etapa seguinte de desidratação foi feita gradualmente em uma bateria crescente de acetona. Primeiramente, foram feitos dois banhos, de dez minutos, em acetona 30%. Em seguida, banhos em acetona a 50%, 70% e 90%, de dez minutos cada um. Por último, três banhos de dez minutos em acetona 100%. Em seguida, foi feita a infiltração gradual da resina Spurr nas amostras (Spurr, 1969).

A infiltração iniciou-se com a mistura resina: acetona 3:1, durante cinco horas. Posteriormente, na proporção 2:2 por doze horas e 1:3 durante seis horas. Finalmente, foi feita infiltração em resina pura por doze horas com uma troca por mais seis horas. Finalizado o processo de infiltração, foi realizada a inclusão, na qual os ovários foram colocados em formas de inclusão de silicone, orientados para a obtenção de cortes longitudinais. Para a polimerização, as formas foram colocadas na estufa a 65°C, durante 72 horas. Após polimerização, secções semi e ultrafinas foram obtidas no ultramicrótomo, modelo Sorvall MBT-2. Para a análise sob microscópio de luz, as secções semifinas montadas em lâminas foram coradas com azul de toluidina.

### 3. RESULTADOS

Cortes semifinos, com aproximadamente 120 nm de espessura, de vinte ovários de *B. brizantha*, acesso BRA 002747, que apresenta modo de reprodução sexual, foram coletados para a análise sob microscopia de luz em campo claro, após a coloração com azul de toluidina (Figuras 1 a 4).

As plantas do acesso BRA 002747 apresentaram um único saco embrionário, localizado na região central do óvulo, um pouco mais próximo à região micropilar. O saco apresentou forma elipsóide, com uma constrição no seu terço chalazal. Na periferia externa do saco embrionário, que contacta o nucelo, foi possível observar regiões estreitas bastante coradas pela toluidina.

Na maioria dos ovários foram observadas três camadas de células formando o tegumento externo, apresentando uma coloração azul menos acentuada do que as células que compõem as duas camadas do tegumento interno. As células tegumentares são cúbicas, apresentando tamanho uniforme e com o núcleo ocupando a maior parte central da célula. Os tegumentos circundam quase todo o óvulo, somente deixando as extremidades pouco afastadas entre si na região micropilar. Na região chalazal, o tegumento externo apresentou-se organizado em três camadas, enquanto que na região micropilar, apenas em duas. Na região micropilar, o tegumento apresentou células com um maior volume quando comparadas com as demais células desta estrutura. Na região entre as células do tegumento interno e as células nucelares, foi possível observar uma coloração mais intensa presente nas paredes celulares.

As células nucelares são bastante vacuolizadas e na região periférica do óvulo apresentaram menor volume, quando comparadas com as da região central. Apenas na região mais próxima da micrópila foi possível observar uma organização dessas células para a formação do canal micropilar. Neste canal, as células nucelares, denominadas labiais, apresentaram-se dispostas em aproximadamente sete camadas. As células labiais são células piramidais, bastante vacuolizadas e com núcleo centralmente situado. As células periféricas do canal apresentaram maior dimensão do que as tegumentares próximas a elas, alongando-se até a região do espaço formado entre as extremidades dos tegumentos.

Na região chalazal do saco embrionário foram observadas células com grande volume, correspondendo às antípodas que ocupam aproximadamente um terço do volume do saco embrionário. Estas células não apresentaram uniformidade em seu tamanho, forma ou quantidade. Núcleo e nucléolo apresentaram grande volume e um número variado de vacúolos com diferentes diâmetros foi observado no citoplasma. Em alguns ovários foi possível detectar, junto às antípodas, células bastante coradas, com aspecto de desorganização .

Na região micropilar foi identificado o aparato da célula-ovo, ocupando um quarto do volume do saco embrionário e composto por duas células sinérgidas e uma célula-ovo. Na maior parte dos sacos examinados, apenas uma sinérgida pôde ser detectada e em alguns, duas sinérgidas. Estas células apresentaram o citoplasma denso, vários pequenos vacúolos que dão um aspecto de "rede" ao citoplasma além da grande quantidade de grânulos, bastante corados. Associada à sinérgida, pôde-se observar

a célula-ovo, que apresentou grandes vacúolos em seu citoplasma. Esta célula também apresentou grânulos com uma coloração acentuada, como os observados nas sinérgidas, entretanto em maior quantidade além de grãos de amido. As células sinérgidas e a célula-ovo localizam-se adjacentes às células labiais do canal micropilar e entre as últimas e o aparato da célula-ovo também foi possível detectar porções estreitas de citoplasma bastante coradas. Em alguns ovários foi possível detectar o aparato filiforme associado às células sinérgidas. Esta estrutura apresenta-se em forma de "taça", com bordas irregulares e aspecto denso heterogêneo.

Próximo ao aparato da célula-ovo, em direção à chalaza, foi observada, em alguns óvulos, a presença de dois núcleos polares contidos na célula central, que pode ser caracterizada pela presença de um enorme vacúolo central e citoplasma concentrado na periferia. Os núcleos polares estão associados à porções densas do citoplasma da célula central, formando uma imagem do nucleoplasma e citoplasma em forma de "meia-lua". Às vezes, duas sinérgidas, às vezes, dois núcleos polares podem estar presentes no saco embrionário.

#### 4. DISCUSSÃO

A análise de secções semifinas seriadas, consome bastante tempo devido ao grande número de secções necessárias de cada ovário (aproximadamente 60), principalmente quando este, em fase avançada de desenvolvimento, apresenta um grande volume. Apesar do longo tempo gasto, esta técnica é de grande vantagem,

devido à riqueza de detalhes sobre o espécimen que pode ser obtida quando comparada com a microscopia de contraste interferencial diferencial de Nomarsky (DIC), usualmente utilizada em análises de sacos embrionários. Com DIC, é possível examinar uma grande quantidade de ovários, em um curto período de tempo, porém sem detalhes morfológicos, como contorno celular e aspectos do citoplasma, pois, com esta técnica, evidenciam-se principalmente os núcleos enquanto as demais estruturas não ficam tão óbvias. Ultramicrotomia de ovários incluídos em resina Spurr, resina acrílica e hidrofóbica, permite a obtenção de secções mais delgadas (120 nm) do que na parafina (1200 nm) ou paraplast (600 nm), favorecendo uma análise mais detalhada do material.

Com esta forma de processamento de material, observa-se menos artefatos devido à fixação química tamponada mais eficiente e ao processo de infiltração mais delicado, à temperatura ambiente. Nas secções mais delgadas, é possível definir mais facilmente, a organização das células no tecido, individualizá-las e determinar características citoplasmáticas, tais como a quantidade de vacúolos e grânulos. Características da parede celular, como espessura e diferentes níveis da intensidade da coloração ficam evidentes nestes cortes. Também a presença de regiões ou células em degeneração é mais evidente. Além disto, pode-se obter cortes ultrafinos concomitantes, para a análise em microscópio eletrônico de transmissão.

Para a análise sob microscópio de luz em campo claro, as secções semifinas foram coradas com azul de toluidina, que apresenta afinidade por componentes celulares ácidos. Células cujo citoplasma apresenta uma

coloração bastante forte, correspondem a células com intensa atividade de síntese protéica, refletindo o elevado o elevado nível de transcrição (Beçak & Paulete, 1976). As paredes celulares ficam com a coloração mais intensa devido à maior concentração de substâncias ácidas nos seus componentes. Células em degeneração devido à perda do sistema de membranas no interior da célula e à liberação de enzimas, também são bastante corada pelo azul toluidina.

As células que formam os tegumentos interno e externo são facilmente reconhecidas devido à sua localização e organização em camadas. Aparentemente, as células do tegumento externo apresentam-se em intensa atividade sintética, provavelmente resultando em altas taxas de divisão celular. Os tegumentos interno e externo já se apresentam em sua forma final de organização nesta fase de desenvolvimento do gametófito, em duas e três camadas, respectivamente. O afastamento das extremidades dos tegumentos na região micropilar confirma que, também nesta espécie, os tegumentos não se unem. Há uma variação no tamanho das células tegumentares nas diferentes regiões do ovário, sugerindo uma provável diferença funcional entre estas células. Entre o tegumento interno e o óvulo, foi observada uma região espessa com coloração azul mais intensa, correspondendo às paredes celulares das células tegumentares e nucelares, cuja constituição aparentemente se diferencia das demais paredes das células do ovário. Estudos serão conduzidos para identificar estes componentes.

O número elevado de vacúolos nas células do nucelo para o armazenamento de substâncias confirma que este tecido auxilia, no fornecimento de compostos para, o

gametófito e na formação do embrião, indicando, assim, que este é um tecido de desenvolvimento (Bouman, 1984, Wakana & Uemoto, 1987).

A localização central do saco embrionário dentro do óvulo é similar àquela descrita em outras espécies (Huang & Russel, 1992). No entorno do saco embrionário, as células com coloração azul bastante acentuada correspondem às células nucelares degeneradas, resultantes da compressão física do crescimento do saco embrionário.

A constrição do saco embrionário na porção chalazal corresponde à região onde se localizam as células do tipo antípoda e esta constrição está relacionada com o processo de celularização destas células. A maior parte das antípodas foi observada no interior do saco, indicando que o gametófito feminino ainda não atingiu a sua total maturação, quando as mesmas estão celularizadas fora do gametófito ou degeneraram. A presença de células com aspecto desorganizado nesta região sugere que antípodas sofrem degeneração ao longo do desenvolvimento do gametófito, antes da completa maturação.

Similarmente descrito para outras espécies (Willemse & Went, 1984 e Vielle et. al., 1994), o aparato da célula-ovo, neste acesso de *B. brizantha*, localiza-se na região micropilar do gametófito e pode ser constituído por duas células sinérgidas e uma célula-ovo ou por uma sinérgida e uma célula-ovo. O aspecto denso do citoplasma destas células devido à intensa coloração azul, associada à presença de inúmeros grânulos e grãos de amido, indica a intensa atividade de síntese protéica e armazenamento de secreções.

O aparato filiforme mostrou estar associado às

células sinérgidas como descrito na maior parte das espécies (Willemse & Went, 1984).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEÇAK, W.; PAULETE, J. Técnicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora, 1976. v. 1, 305p.

BOUMAN, F. The ovule. In: JOHRI, B.M., ed. Embryology of angiosperms. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p.123- 157.

HANNA, W. W. ; BASHAW, E. C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Science*, v.27, p.1136-1139, 1981.

HUANG, B.-Q. ; RUSSEL, S. D. Female germ unit: organization, isolation and function In: RUSSEL, S. D.; DUMAS, C., ed. Sexual reproduction in flowering plants. San Diego: Academic Press., 1992. p.233 - 293. (*International Review of Cytology*, v. 140).

NOMURA, K.; KOMAMINE, A. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiology*, v. 79, n.4, p.988-991, 1985.

SAVIDAN, Y.; DUJARDIN, M. Apomixis. La prochaine revolution verte? *La Recherche*, v.23, p.326-334, 1992.

- SERRÃO, E. A. D. ; SIMÃO NETO, M. Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* da Amazônia: *B. decumbens* Staf e *B. ruziziensis* Germain et Everard. Belém: IPEAN, 1971. 31p. (IPEAN. Estudo sobre forrageiras na Amazônia, v. 2, n.1).
- SPURR, A. R. A new viscosity resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research*, v. 26, p.31- 43, 1969.
- VALLE, C. B.; GLIENKE, C. New sexual genotypes in *Brachiaria*. *Apomixis Newsletter* , v.3, p. 11-13, 1991.
- VALLE, C.B. do; GLIENKE, C. ; LEGUIZAMON, G.O.C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. *Apomixis Newsletter*, v. 7, p.42-46, 1994.
- VALLE, C. B.do ; MILES; J. W. Breeding of apomitic species. *Apomixis Newsletter*, v.5, p. 37-47, 1992.
- VIELLE, J.-Ph,; BURSON, B.L.; BASHAW, E.C. ; HUSSEY, M. A. Early fertilization events in the sexual and aposporous egg apparatus of *Pennisetum ciliare* (L.) Link. *The Plant Journal*, v.8, n.2, p. 309-316, 1995.
- WAKANA, A. ; UEMOTO, S. Adventice embryogenesis in *Citrus*, I. The occurrence of adventices embryos without pollination or fertilization. *American Journal of Botany*, v. 74, p. 517-530, 1987.

WILLEMSE M.T.M. ; WENT, J.L. van. The female gametophyte. In: JOHRI, B.M., ed. Embryology of angiosperms. Berlin: Springer- Verlag, 1984. p.159 - 195

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embriogenesis: a model for early development in higher plants. Plant Cell, v.5, n.10, p.1411-1423, 1993.

## **ANEXO 6**

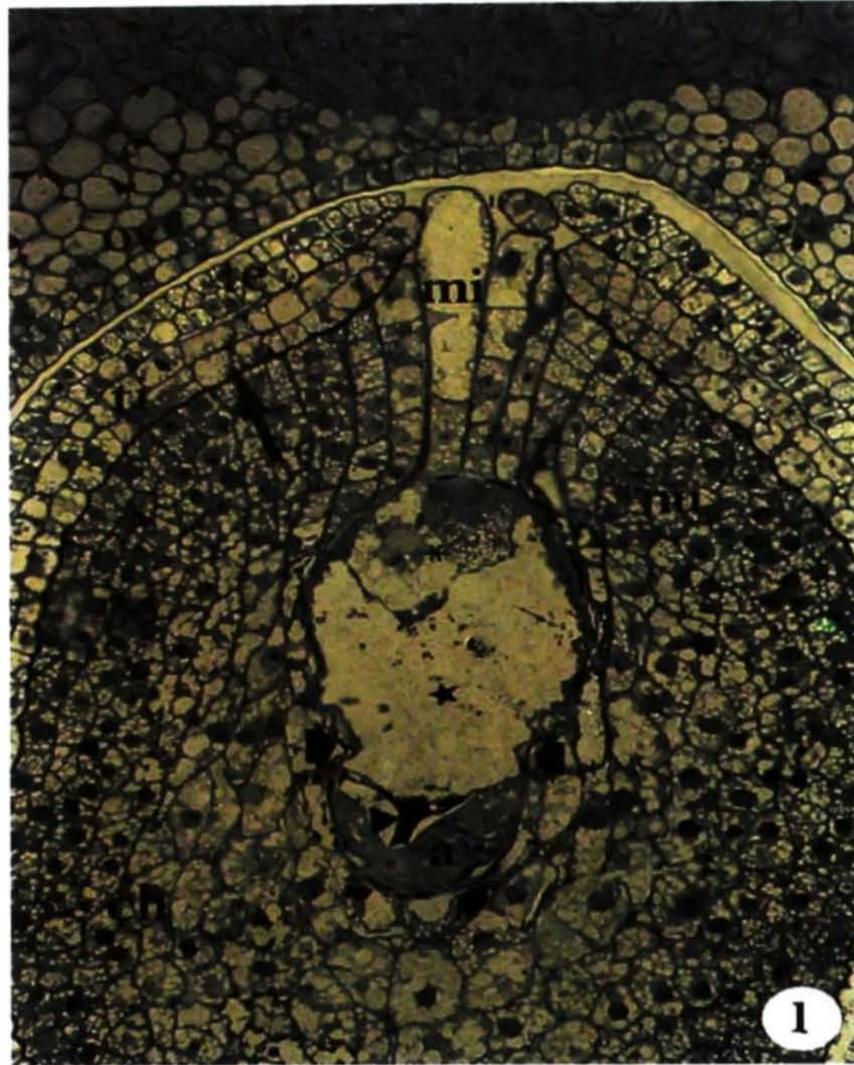


Fig. 1. Observa-se o tecido ovariano (ov) em torno do óvulo, a seguir o tegumento externo (te) e interno (ti), cujas extremidades não se conectam. Nota-se uma coloração forte nas paredes (seta) presentes nas células do tegumento interno e do nucelo (nu), indicando maior espessura e alta concentração de substâncias ácidas na parede. Saco embrionário (estrela) apresentando uma cosntrição (cabeça de seta) na terça parte chalazal (ch), onde podem ser detectadas as antípodas (a). Algumas destas células sofreram degeneração ao longo do desenvolvimento do gametófito e se mostram como uma mancha escura (triângulo). Ainda no interior do saco, está presente o aparato da célula-ovo (asterisco) na região micropilar (mi). As células alongadas, denominadas células labiais, formam o canal micropilar que se estende até a região entre as extremidades dos integumentos. X 40.



Fig. 2. Organização geral do aparato da célula-ovo, localizado na região micropilar onde se observa a célula-ovo (o), cujo citoplasma apresenta grandes vacúolos, núcleo e nucleolo (n) evidentes e a presença de uma única sinérgida (si), com citoplasma contendo inúmeros pequenos vacúolos, dando um aspecto de "rede" à célula. Na região oposta observam-se as antípodas. Nucelo (nu). X 40.

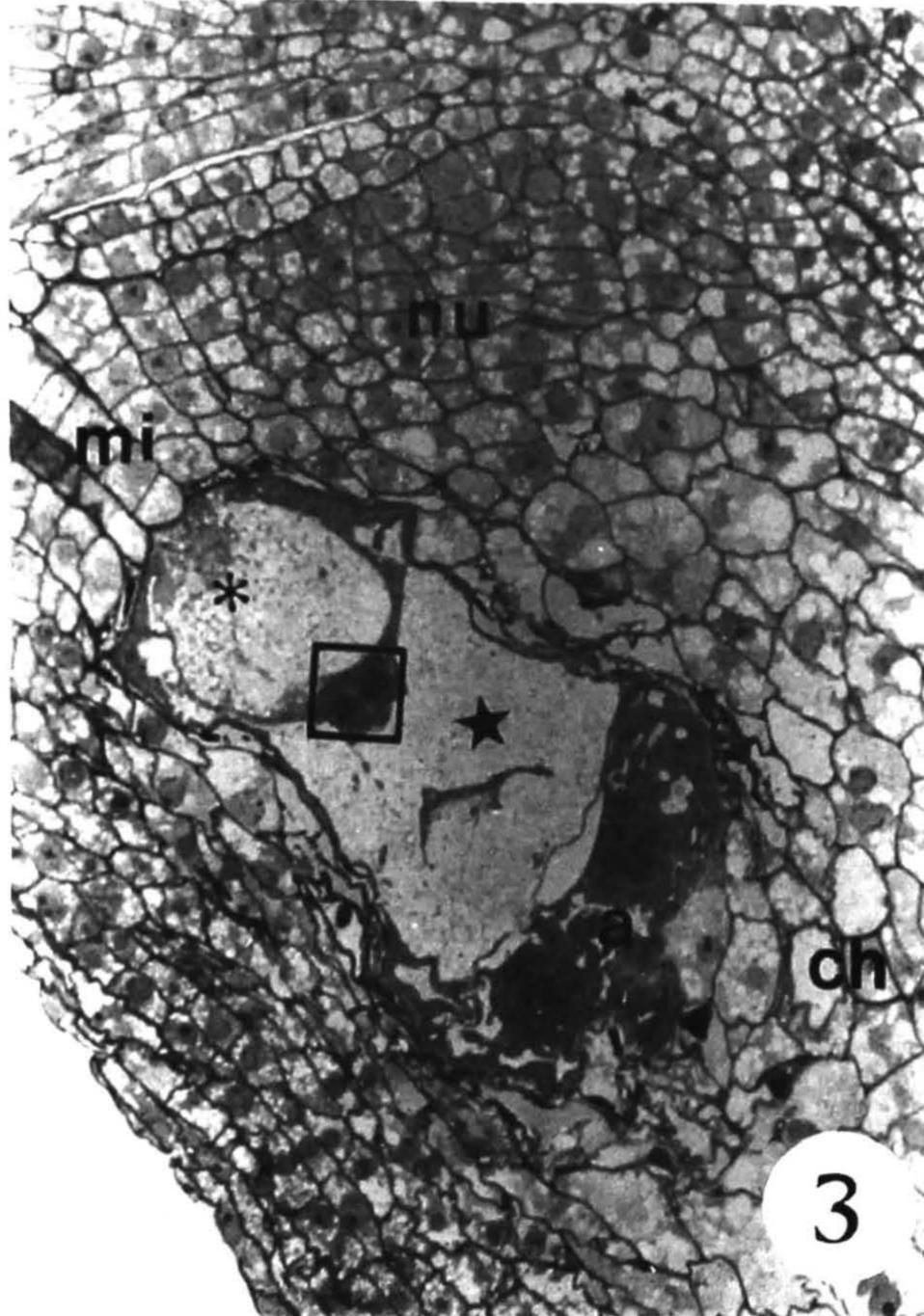


Fig. 3. Aparato da célula-ovo (asterisco) associado a dois núcleos polares (quadrado) presentes na célula central (estrela). Antípodas (a) com citoplasma bastante denso podem ser observadas na região chalazal (ch). Nucelo (nu). Micrópila (mi). X 40.

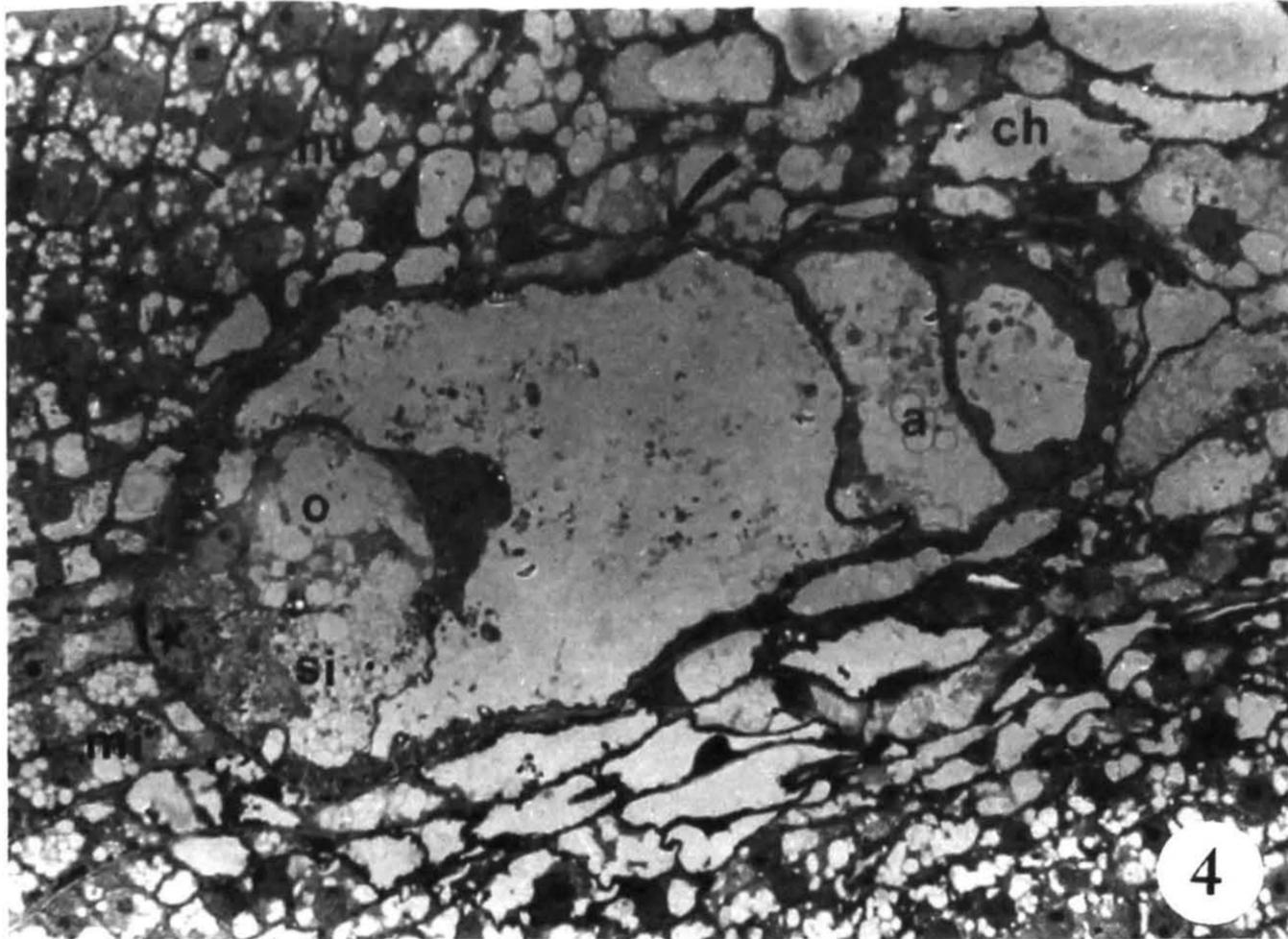


Fig. 4. Detalhe do saco embrionário onde se observa o nucelo (nu) contendo células com volume e forma variadas, sendo bastante vacuolizadas. Algumas das células nucleares justapostas ao saco apresentam aspecto denso, correspondendo a células degeneradas pela compressão do crescimento do saco (seta). Associada às sinérgidas, observa-se a célula-ovo (o) e em oposição, distingue-se um núcleo polar da célula central (asterisco). Duas antípodas (a) podem ser observadas na região chalazal (ch). Aparato filiforme (estrela). X 63.



---

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Mesa de Trabalho em Recursos Genéticos*

*Impressão e acabamento:  
Embrapa Produção de Informação*