

Boletim de Pesquisa 74

e Desenvolvimento ISSN 1676 - 1340

Novembro, 2004

**IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS DE *Brachiaria* COM
INTERESSE AO ESTUDO DA APOMIXIA FACULTATIVA**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

José Amauri Dimárzio
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Dietrich Gerhard Quast
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena T. Luz Barbosa
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe -Geral

Maurício Antonio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

ISSN 1676 - 1340
Novembro, 2004

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 74

IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS DE *Brachiaria* COM INTERESSE AO ESTUDO DA APOMIXIA FACULTATIVA

Ana Claudia G. Araujo

Rosana Falcão

Kenya Carla R. Simões

Vera T. de C. Carneiro

**BRASÍLIA, DF
2004**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax:
(61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: ***Maria da Graça S. P. Negrão***

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

Identificação de acessos de *Brachiaria* com interesse ao estudo da apomixia facultativa / Ana Claudia G. Araujo ... [et al.]. -- Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; n. 74)

1. *Brachiaria* – Acessos - Apomixia. 2. Apomixia – *Brachiaria*.
I. Araújo, Ana Claudia G. II. Série.

575.49 - CDD 21

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Material e Métodos	13
Resultados	15
Discussão	24
Agradecimentos	26
Referências bibliográficas.....	27

IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS DE *Brachiaria* COM INTERESSE AO ESTUDO DA APOMIXIA FACULTATIVA

Ana Claudia G. Araujo¹

Rosana Falcão²,

Kenya Carla R. Simões³

Vera T. de C. Carneiro⁴.

Resumo

Em plantas de *Brachiaria*, importante forrageira em países tropicais, a apomixia foi identificada na maioria dos acessos poliplóides. Nessas plantas, o saco embrionário é do tipo *Panicum*, com origem apospórica e meioticamente não reduzido. Nos acessos sexuais, diplóides em sua maioria, o saco embrionário formado é do tipo *Polygonum*, meioticamente reduzido e morfologicamente distinto daquele presente nas plantas apomíticas do gênero. Em vários acessos apomíticos, também pode ser observado um saco embrionário do tipo *Polygonum*, associado ou não àqueles do tipo *Panicum*. A presença de saco embrionário do tipo *Polygonum* em *Brachiaria* é considerada um indicativo de apomixia facultativa. Entretanto, por definição, a apomixia facultativa consiste da formação de sementes viáveis a partir da fecundação de sacos embrionários do tipo *Polygonum* nos óvulos de plantas apomíticas. Em *Brachiaria* ainda não está determinado se ocorre formação de sementes viáveis dessa forma. Visando verificar a ocorrência de apomixia facultativa em *Brachiaria*, estudos para identificação de acessos de *Brachiaria* com características reprodutivas de interesse ao estudo da apomixia facultativa foram iniciados em cinco acessos cujas análises preliminares já haviam indicado uma elevada frequência de sacos embrionários tipo *Polygonum*. A maior frequência desse tipo de saco embrionário foi confirmada nos acessos BRA002232 e BRA003450 de *B. brizantha*. Observações indicaram que

¹ Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
e.mail: guerra@cenargen.embrapa.br

² Bióloga, BsC, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Estudante de Biologia, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

aproximadamente 42% dos ovários continham além de saco embrionário do tipo *Panicum*, um saco embrionário tipo *Polygonum*. Esse último foi observado tanto na região mais próxima à micrópila quanto à calaza. A origem meiótica e apospórica desses sacos embrionários, respectivamente, foi confirmada. Essas plantas possuem pólen viável, são autocompatíveis e férteis. A embrionia precoce está presente e a poliembrionia não foi observada. Devido ao maior número de sacos embrionários tipo *Polygonum* situados próximo à micrópila, posição mais favorável à fecundação e à maior fertilidade do acesso BRA003450, posterior verificação da natureza dos embriões e indução da formação de embrião zigótico através de polinização controlada serão conduzidas nesse acesso.

Palavras chave: aposporia, embriogênese, fertilidade, saco embrionário, sexualidade, reprodução.

Abstract

In *Brachiaria* plants, an important forage grass in tropical countries, apomixis was identified in the majority of the polyploid accessions. In these plants, the embryo sac is meiotically unreduced, with aposporous origin and of the *Panicum* type. In the sexual accessions, mostly diploids, the embryo sac formed is meiotically reduced and of the *Polygonum* type which is morphologically different from those present in the apomictic plants. In many apomictic accessions, one embryo sac of the *Polygonum* type can also be present, associated or not within the same ovule, with one or more *Panicum* type of embryo sac. The presence of embryo sac of the *Polygonum* is considered an indicative of facultative apomixis. However, by definition, it consists in seed formation after the fertilization of the *Polygonum* embryo sac within the ovule of an apomictic plant. Up to now, it has not been determined if viable seeds are being formed by sexuality in apomictic *Brachiaria*. Aiming the identification of accessions with reproductive aspects of interest to determine the occurrence of facultative apomixis, studies were done with five *Brachiaria* sp. apomictic accessions with an indicative of high frequency of *Polygonum* embryo sacs. Higher frequency of this type of embryos sac was confirmed in the accessions BRA002232 and BRA003450 of *B. brizantha*, with 42% of the ovaries showing *Panicum* and *Polygonum* type of embryo sacs. The latest was situated either in micropyle or in the chalazal pole of the ovary. The meiotic and aposporous origin of the embryo sacs was confirmed. Both plants are self-compatible and fertile and the pollen is viable. Precocious embryony was observed while polyembryony was not detected. BRA003450 was the accession chosen to evaluate detailed the nature of the embryos formed and to carry on the induction of zygotic embryos based on the its higher fertility and larger presence of the embryo sac of the *Polygonum* in micropyle pole, a more favorable position to receive the pollen during the fertilization.

INTRODUÇÃO

Em mais de 40 famílias de angiospermas, principalmente Poaceae, Asteraceae e Rosaceae, várias espécies desenvolveram a habilidade de contornar os mecanismos sexuais de reprodução e originar sementes de forma assexual, ou seja, por apomixia. O termo apomixia vem do grego e significa "sem mistura" (Nogler, 1984). A progênie formada nessas plantas é uma cópia genética da planta-mãe e a apomixia é, portanto, uma forma natural de clonagem por sementes (Asker & Jerling, 1992, Koltunow, 1993, 1995, Savidan, 2000).

Características citológicas e moleculares da reprodução apomítica, seu controle genético e a relação com o mecanismo sexual são aspectos que vêm sendo explorados por vários grupos de pesquisa. Isso se deve principalmente ao interesse de se introduzir o caráter apomítico em plantas que se reproduzem exclusivamente por sexualidade e dessa forma, promover a fixação de genótipos elite e do vigor híbrido em plantas de interesse agrônomico (Asker & Jerling, 1992, Koltunow, 1993, 1995, Savidan, 2000, Koltunow & Grossniklaus 2003, Bicknell & Koltunow 2004).

Dependendo da origem do embrião, a apomixia pode ser classificada em apomixia esporofítica e gametofítica (Nogler, 1984, Asker & Jerling, 1992, Koltunow, 1993, 1995, Savidan, 2000, Dusi et al., 2000). Na embrionia esporofítica ou embrionia adventícia, embriões são formados diretamente de células somáticas do tecido nucelar ou tegumentares do óvulo (iniciais embriogênicas) sem que ocorra a formação de sacos embrionários (Lakshmana & Ambegaokar 1984, Koltunow, 1993). Na apomixia gametofítica, o desenvolvimento do embrião se dá em um saco embrionário não reduzido (apomeiose), independentemente da fecundação, ou seja, autonomamente (partenogênese). Dependendo da origem do saco embrionário, a apomixia gametofítica pode ser classificada em diplospórica ou apospórica (Nogler, 1984, Asker & Jerling, 1992, Koltunow, 1993, 1995).

Na porção reprodutiva feminina ou óvulo das plantas que se reproduzem sexualmente, uma célula do nucelo se diferencia em célula mãe do megásporo (CMM). Essa célula forma quatro megásporos haplóides após divisão meiótica. Destes, três degeneram e o megásporo sobrevivente, após três mitoses, forma

o saco embrionário reduzido. Esse saco embrionário é monospórico, do tipo *Polygonum* e comum a 70% das angiospermas (Willemse & van Went, 1984). Este é constituído por sete células: a oosfera, duas sinérgides, a célula central contendo dois núcleos polares e três antípodas (Reiser & Fischer, 1993). A fecundação da oosfera e do núcleo polar pelos gametas masculinos é geralmente necessária para que ocorra a formação da semente e fruto nessas plantas (Willemse & van Went, 1984).

Brachiaria (Trin.) Griseb. é um gênero pertencente à família Poaceae que possui cerca de 100 espécies que ocorrem principalmente na África (revisto por Dusi et al., 2000) e apresenta várias espécies forrageiras, economicamente importantes em diversos países tropicais (Renvoize et al., 1996). Uma análise do modo de reprodução de 14 espécies de *Brachiaria* reunida pelo CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical, realizada numa coleção de 251 acessos indicou a ocorrência de apomixia e sexualidade em vários acessos dentro de uma mesma espécie, para várias espécies no gênero (Valle, 1990).

Em *B. brizantha* (A. Rich.) Stapf, uma das espécies forrageiras mais importantes no Brasil (Valle & Savidan, 1996), apenas um acesso foi caracterizado como diplóide ($2n = 2x = 18$), sexual, BRA002747 (Carnahan & Hill, 1958, Valle & Glienke, 1991). Nesse acesso, as plantas contem um saco embrionário tipo *Polygonum* com seis antípodas (Valle, 1990, Valle & Savidan, 1996, Araujo et al., 2000, Araujo & Falcão, 2003, Araujo et al., 2005). Os demais acessos de *B. brizantha* são poliplóides, sendo tetraplóides na maioria ($2n = 4x = 36$). Estes apresentam apomixia do tipo apospórica, ou seja, células do nucelo dão origem aos sacos embrionários (Valle, 1986, Valle, 1990, Valle & Savidan, 1996, Araújo et al., 2000). Essas células que originam os sacos embrionários são designadas iniciais apospóricas e através de mitoses, dão origem a um ou mais sacos embrionários em um mesmo óvulo. A diferenciação das iniciais apospóricas ocorre durante a degeneração dos megásporos da via sexual de reprodução no cv. Marandu de *B. brizantha*, acesso tetraplóide, apomítico (Araujo et al., 2000). Ainda, pode ocorrer durante ou após a meiose da célula mãe do megásporo, como observado em *B. decumbens*, outra importante forrageira no Brasil (Dusi & Willemse, 1999). O saco embrionário formado é do tipo *Panicum*, com a célula central contendo apenas um núcleo

polar e não se observa antípodas (Valle, 1986, Valle, 1990, Valle & Savidan, 1996, Dusi & Willemse, 1999, Araujo et al., 2000).

A diferença estrutural entre o saco embrionário do tipo *Polygonum* e do tipo *Panicum* é bastante utilizada para inferir sobre o modo de reprodução dos acessos de *Brachiaria*.

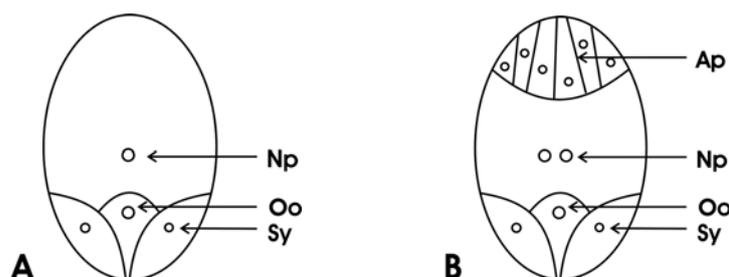


Figura 1: Esquemas representativos de sacos embrionários de *Brachiaria brizantha*. A) Saco embrionário do tipo *Panicum* contendo na micrópila uma oosfera (Oo) associada a duas sinérgides (Sy) e a célula central com um núcleo polar (Np). B) Saco embrionário do tipo *Polygonum* contendo na micrópila uma oosfera (Oo) associada a duas sinérgides (Sy), a célula central com dois núcleos polares (Np) e seis antípodas (Ap) na calaza.

No cv. Marandu de *B. brizantha*, múltiplas iniciais apospóricas podem ser observadas durante a megasporogênese. Entretanto, na maturidade, a maioria dos óvulos desse acesso apresenta apenas um único saco embrionário do tipo *Panicum*. A presença de embrião em formação no cv. Marandu pode ocorrer antes ou durante a antese, sugerindo a ocorrência de embrionia precoce ou ainda, após a antese (Araujo et al., 2000).

Como nas plantas sexuais, os gametas masculinos das plantas apomíticas são meioticamente reduzidos, pois a apomixia ocorre apenas na porção reprodutiva feminina. Esses gametas são úteis para a formação do endosperma em *Brachiaria*, pois diferentemente do embrião, a formação desse tecido depende da fecundação do núcleo polar da célula central, ou seja, ocorre pseudogamia (Ngendahyo 1988, Alves et al, 2001).

As plantas de *Brachiaria* com reprodução sexual apresentam exclusivamente saco embrionário do tipo *Polygonum* (revisto por Valle e Savidan, 1996). Já nas plantas apomíticas, além dos sacos embrionários apospóricos, pode ocorrer no mesmo óvulo, a formação de um saco

embrionário do tipo *Polygonum*. Esse saco embrionário do tipo *Polygonum* presente nas plantas apomíticas pode ser fecundado, formar um zigoto e dar origem a uma progênie através da sexualidade, caracterizando assim a apomixia facultativa, que por definição, é a ocorrência de sementes viáveis oriundas da fecundação de um saco embrionário do tipo *Polygonum* em uma planta apomítica (Nogler, 1984, Koltunow, 1993).

De fato, análises realizadas em *Brachiaria* indicam a presença de sacos embrionários do tipo *Polygonum* em diferentes freqüências nos óvulos das plantas apomíticas, quase sempre associados a um ou múltiplos sacos embrionários apospóricos. Valle (1986) indicou a presença de saco embrionário do tipo *Polygonum* associado a outro do tipo *Panicum* em 14 dos 16 acessos apomíticos de *B. brizantha*, com rara ocorrência de um saco embrionário tipo *Polygonum* associado a dois do tipo *Panicum* em um mesmo óvulo. Posteriormente, Valle (1990) determinou que 63 dos 156 acessos apomíticos de *B. brizantha* analisados apresentavam saco embrionário do tipo *Polygonum* em uma freqüência entre 0-74% e que a ocorrência de dois tipos de sacos embrionários estava presente na maioria das espécies analisadas de *Brachiaria*. Mais recentemente, Valle & Savidan (1996) estenderam essa freqüência para todos os 274 acessos identificados com apomíticos em *B. brizantha* identificados. Apesar da alta freqüência de dois tipos de sacos embrionários no mesmo óvulo indicada para *B. brizantha*, no cv. Marandu apenas 2% dos ovários apresentam essa organização (Araujo et al., 2000).

A ocorrência de dois tipos de sacos embrionários em um mesmo óvulo nas plantas apomíticas de *Brachiaria* é considerada um indicativo de apomixia facultativa (Valle & Savidan, 1996). No entanto, devido à dificuldade de se identificar segregação fenotípica na progênie, ainda não está determinado se esses sacos embrionários podem ser fecundados e originar sementes viáveis.

Para melhor compreender os mecanismos de reprodução em *Brachiaria* apomítica e determinar características que auxiliem na identificação da ocorrência de reprodução sexual e indução de formação de embrião zigótico em *B. brizantha*, estudos para identificação de acessos de *Brachiaria* com características reprodutivas de interesse ao estudo da apomixia facultativa foram iniciados. Dentre os diversos acessos apomíticos de *Brachiaria* estudados (Valle, 1990), cinco acessos com indicativo de elevada apomixia

facultativa foram selecionados. Desses, uma maior frequência de saco embrionário do tipo *Polygonum* foi confirmada nos acessos BRA002232 e BRA003450 de *B. brizantha*, onde aproximadamente 42% dos ovários continham esse tipo de saco embrionário, cuja origem meiótica foi confirmada. Saco embrionário do tipo *Polygonum* foi observado tanto na posição próxima à micrópila quanto à calaza. A viabilidade polínica, autocompatibilidade, fertilidade, ocorrência de embrionia precoce e poliembrionia foram analisadas. Devido ao maior número de sacos embrionários do tipo *Polygonum* situados próximo à micrópila e à maior fertilidade do acesso BRA003450, esse será o acesso onde análises sobre apomixia facultativa serão conduzidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Dentre os acessos tetraplóides, apomíticos de *Brachiaria* cujas observações indicaram alta frequência de sacos embrionários do tipo *Polygonum*, cinco foram selecionados. Mudanças desses foram gentilmente cedidas (C.B. do Valle) e transferidas para o canteiro experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF. Dois acessos de *B. Brizantha*, BRA002232 e BRA003450, dois de *B. decumbens*, BRA004570 e BRA001996 e um de *B. jubata*, BRA002348 foram selecionados. O acesso tetraplóide, apomítico de *B. brizantha* BRA000591, cv. Marandu foi utilizado para efeito de comparação.

Análise morfológica de saco embrionário maduro em óvulos clarificados

Em 2002, aproximadamente 60 pistilos de flores em antese de cada acesso foram coletados das plantas em Brasília. Os ovários foram isolados, fixados em uma mistura contendo formaldeído 40%:ácido acético:etanol 50%, (5:5:90, v/v) por 24h a 4°C e mantidos em etanol 70% a 4°C. As amostras foram gradualmente desidratadas em uma bateria crescente de etanol (80, 90, 95 e 100%), clarificados lentamente em soluções de xilol:metilsalicilato em proporções crescentes de metilsalicilato (3:1, 1:1, 1:3, v/v) até que este

estivesse puro. Os ovários clarificados foram montados em lâminas de vidro contendo uma gota de metilsalicilato na concavidade e observados. Análise do número e da estrutura dos sacos embrionários foi realizada em microscópio Zeiss Axiophot sob contraste de interferência diferencial (DIC).

Em 2003, 120 pistilos de flores em antese foram coletados durante o período de floração dos acessos BRA002232 e BRA003450 de *B. brizantha*. Flores de BRA002232 foram coletadas durante os meses de fevereiro a maio, enquanto as de BRA003450, de fevereiro a junho. Os ovários foram preparados e analisados como descrito no parágrafo anterior.

Aproximadamente 100 pistilos de flores em antese do cv. Marandu foram coletados, processados e analisados conforme anteriormente descrito.

Análise do desenvolvimento de sacos embrionários em óvulos clarificados

Durante o período de floração de 2004, aproximadamente 20 pistilos contendo ovários em diferentes estágios de desenvolvimento, correspondendo a megagametogênese e megasporogênese (estágios I, II e III, IV, respectivamente - veja Araujo et al., 2000 para detalhes da classificação dos estágios) dos dois acessos selecionados de *B. brizantha* foram coletados. Os ovários isolados em diferentes estágios de desenvolvimento foram fixados, clarificados e observados em DIC conforme anteriormente descrito visando à identificação dos eventos de formação de sacos embrionários.

Estimativa da fertilidade

Espiguetas com flores dos dois acessos de *B. brizantha* cuja antese havia ocorrido há um ou dois dias foram identificadas durante o mês de abril, maio e junho de 2004. Os racemos contendo pelo menos 2/3 de suas espiguetas com essa identificação foram isolados em envelopes de papel. Após aproximadamente 12 dias, esses racemos foram coletados e o número total de espiguetas identificadas foi determinado. Aproximadamente 250 espiguetas foram identificadas em cada acesso e dentre essas, foi determinado o número de cariopses cheias. A estimativa da fertilidade foi baseada na razão

entre o número de cariopses cheias e o número total de espiguetas identificadas. Experimento similar foi conduzido no cv. Marandu.

Estimativa de poliembrionia

O número de sementes contendo mais de um embrião foi determinado nos dois acessos de *B. brizantha* selecionados e no cv. Marandu após escarificação.

Indicação de compatibilidade polínica através de microscopia de fluorescência

Para se avaliar a ocorrência de compatibilidade polínica nos dois acessos de *B. brizantha* após autopolinização, verificou-se a ocorrência de grãos de pólen aderidos à porção ramificada do estigma e a presença de tubos polínicos no estilete e parede do ovário. Pistilos foram coletados 2h após a auto polinização, fixados em uma mistura contendo formaldeído 40%:ácido acético:etanol 50%, (5:5:90, v/v) por 24h a 4°C, diafanizados em solução ácida (NaOH 5N), lavados em água e colocados em uma lâmina histológica com concavidade, juntamente com uma gota de solução aquosa de azul de anilina 1% por 6h (Peter Gibbs à partir de Martin, 1958). Esses pistilos foram analisados em microscópio Zeiss Axiophot utilizando a fluorescência (lâmpada UV e filtro de 450nm) buscando-se observar grãos de pólen e tampões de calose formados durante o crescimento do tubo polínico.

RESULTADOS

As análises de ovários clarificados dos cinco acessos apomíticos selecionados das espécies *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. jubata* confirmaram a alta frequência de sacos embrionários do tipo *Polygonum*. Entretanto, essas observações indicaram frequências mais baixas do que aquelas preliminarmente determinadas⁵. Dos cinco acessos analisados, foi verificado

⁵ Comunicação pessoal da Dra. C. B. do Valle, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte à pesquisadora Ana Claudia Guerra de Araújo, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em 17/07/2002.

que os dois de *B. brizantha*, BRA002232 e BRA003450, apresentaram o maior número de sacos embrionários do tipo *Polygonum*. Esses dois acessos foram selecionados para estudos mais detalhados sobre as características reprodutivas de interesse ao estudo da apomixia facultativa.

Aproximadamente 52% dos óvulos analisados nos acessos de *B. brizantha*, BRA002232 e BRA003450 continham exclusivamente sacos embrionários do tipo *Panicum* (tabela I). Esses foram morfológicamente identificados como tais, pois continham uma oosfera, duas sinérgides e a célula central uninucleada. Entretanto, 43% dos óvulos dos acessos BRA002232 e 42% de BRA003450 continham um saco embrionário do tipo *Polygonum*, associado ou não a um ou mais do tipo *Panicum* (tabela I). Estes sacos embrionários apresentaram estrutura típica, contendo oosfera e duas sinérgides, a célula central binucleada e seis antípodas.

Tabela I: Número de ovários de flores coletadas em antese dos acessos BRA002232 e BRA003450 de *Brachiaria brizantha* contendo sacos embrionários do tipo *Panicum* e do tipo *Polygonum*.

		Número de ovários					
Tipo e número de SE em um mesmo óvulo	Acessos	fevereiro	março	abril	maio	junho	total
<i>Panicum</i>	BRA002232	36	07	12	09	ND	64
	BRA003450	28	17	ND	13	02	60
<i>Polygonum</i>	BRA002232	01	0	0	0	ND	01
	BRA003450	05	02	ND	05	0	12
<i>Panicum e Polygonum</i>	BRA002232	30	07	09	07	ND	53
	BRA003450	20	12	ND	03	01	36
2 SE contendo 2 núcleos	BRA002232	04	0	0	0	ND	04
	BRA003450	02	0	ND	01	0	03
SE não diferenciado	BRA002232	01	01	01	0	ND	03
	BRA003450	01	02	ND	0	01	04
Total	BRA002232	72	15	22	16	ND	125
	BRA003450	56	33	ND	22	04	115

ND: não determinado.

SE: saco embrionário.

A maioria dos ovários em BRA002232 e BRA003450, 81% e 69%, respectivamente, apresentaram mais de um saco embrionário por óvulo, onde dois ou mais sacos embrionários do tipo *Panicum* foram mais freqüentemente observados. Aproximadamente 18% e 27% dos ovários, respectivamente, apresentaram somente um saco embrionário (tabela II), ou do tipo *Polygonum*

(1% e 10%, respectivamente) ou do tipo *Panicum* ou mal formados (17%) (tabelas I e II). Dentre os 125 ovários analisados do acesso BRA002232, 23% continham três sacos embrionários enquanto outros 23% continham quatro sacos embrionários. Já no acesso BRA002234, dos 115 ovários analisados, 31% apresentaram dois sacos embrionários, 20% continham três e 10% continham quatro. O número de óvulos apresentando cinco, seis ou sete sacos embrionários nos dois acessos foi menor do que aqueles contendo dois, três e quatro sacos embrionários (tabela II).

Tabela II: Número de sacos embrionários presentes em um mesmo óvulo de ovários das flores coletadas em antese dos acessos BRA002232 e BRA003450 de *Brachiaria brizantha*.

Número de ovários							
Número de SE em um mesmo óvulo	Acessos	fevereiro	março	abril	maio	junho	total
1	BRA002232	08	02	05	07	ND	22
	BRA003450	12	06	ND	12	01	31
2	BRA002232	29	19	03	09	ND	07
	BRA003450	17	11	ND	06	02	36
3	BRA002232	19	05	04	01	ND	29
	BRA003450	14	07	ND	02	0	23
4	BRA002232	14	02	02	01	ND	29
	BRA003450	06	04	ND	02	0	12
5	BRA002232	02	02	02	0	ND	05
	BRA003450	05	01	ND	0	0	06
6	BRA002232	0	0	0	0	ND	0
	BRA003450	01	01	ND	0	0	02
7	BRA002232	0	01	0	0	ND	01
	BRA003450	0	0	ND	0	0	0
SE não diferenciado	BRA002232	0	01	0	0	ND	01
	BRA003450	01	03	ND	0	01	05
Total	BRA002232	72	15	22	16	ND	125
	BRA003450	56	33	ND	22	04	115

ND: não determinado.

SE: saco embrionário.

Nos dois acessos, foi observada a presença de saco embrionário do tipo *Polygonum* ou do tipo *Panicum* na região mais próxima à micrópila. Em BRA002232, 13% dos sacos embrionários situados nessa posição eram do tipo *Polygonum*, 79% do tipo *Panicum* e 8% eram sacos embrionários mal formados, enquanto que em BRA003450, 20%, 57% e 23%, respectivamente (tabela III).

Tabela III: Número de ovários de flores coletadas em antese dos acessos BRA002232 e BRA003450 de *Brachiaria brizantha* contendo saco embrionário do tipo *Polygonum* ou *Panicum* situado na posição mais próxima à micrópila.

Tipo de SE na micrópila	Acessos	Número de ovários					
		fevereiro	março	abril	maio	junho	total
<i>Panicum</i>	BRA002232	58	10	19	12	ND	99
	BRA003450	29	20	ND	15	02	66
<i>Polygonum</i>	BRA002232	10	02	01	03	ND	16
	BRA003450	11	04	ND	07	01	23
SE não diferenciado	BRA002232	04	03	02	01	ND	10
	BRA003450	16	09	ND	0	01	26
Total	BRA002232	72	15	22	16	ND	125
	BRA003450	56	33	ND	22	04	115

ND: não determinado.
SE: saco embrionário.

A quantidade, tipos e posição dos sacos embrionários no mesmo óvulo foram bastante similares para os dois acessos nos diferentes meses de coleta (tabelas I, II e III).

Nas análises durante o desenvolvimento do óvulo, foi determinada a ocorrência de uma célula mãe do megásporo (MMC) no nucelo tanto no estágio I como no II, correspondentes a megasporogênese. MMC são células cúbicas, volumosas, com parede celular bastante espessa e núcleo evidente. No estágio II, freqüentemente foi observada a presença de MMC binucleada ou tétrade de megásporos, normalmente disposta linearmente (Fig. 2). Os megásporos, células haplóides formadas após a meiose da MMC, apresentaram-se com forma cúbica e menor volume do que aquele da MMC, sendo suas paredes celulares e núcleos bastante evidentes. Grande quantidade de material denso correspondendo a células do nucelo em degeneração foi observada em torno dos megásporos.

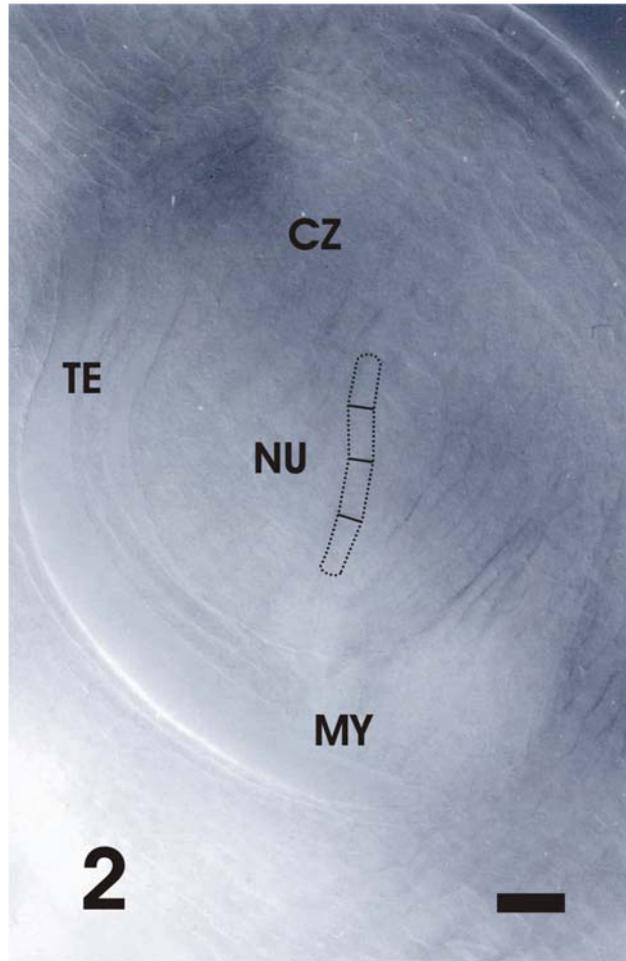


Figura 2: Fotomicrografia em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) de ovário clarificado do acesso BRA002232 de *B. brizantha* mostrando tetrade de megásporos linearizados delimitados na região central do nucelo. Micrópila (MY). Calaza (CZ). Tegumentos (TE). Nucelo (NU). Barra correspondendo a 500 μm .

Durante a megasporogênese, nos estágios III e IV, foi detectada tanto a presença de megásporos viáveis, como indicativos morfológicos da degeneração dessas células, os acúmulos de material denso na região correspondendo à posição da tetrade durante estágio anterior de desenvolvimento. Em muitos ovários, na porção mais próxima à calaza, era observada a presença de um megásporo sobrevivente associado à degeneração dos demais megásporos (Fig. 3).

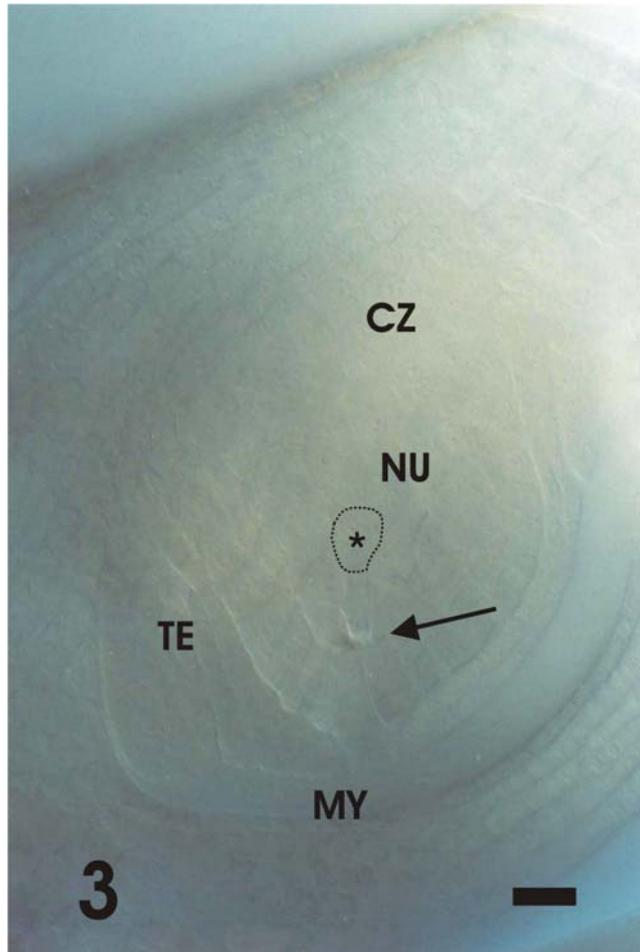


Figura 3: Fotomicrografia em DIC de ovário clarificado do acesso BRA003450 de *B. brizantha* mostrando uma célula com maior volume, situada mais próximo à calaza (CZ) correspondendo ao megásporo sobrevivente circundado, com grande vacúolo central e a espessa parede celular. Mais próximo à micrópila (MY) observa-se o processo de degeneração dos megásporos identificado através do acúmulo de material denso (seta). Tegumentos (TE). Nucelo (NU). Barra correspondendo a 500 μm .

O volume do megásporo sobrevivente é maior que daqueles das células adjacentes e dos demais megásporos e o citoplasma apresenta um vacúolo central bastante evidente. Durante etapas posteriores de desenvolvimento, foi possível observar no megásporo sobrevivente, a presença de dois núcleos de tamanho similar separados por um grande vacúolo, sugerindo a funcionalidade desse megásporo para a formação do saco embrionário do tipo *Polygonum*. Em outros ovários coletados em estágios III e IV, acúmulo de material denso correspondendo à degeneração dos megásporos estava associado a algumas células viáveis do nucelo morfologicamente diferenciadas. Essas células estavam situadas mais calazalmente, com maior volume, parede celular mais espessa, aspecto citoplasmático menos denso e um grande vacúolo,

correspondendo às iniciais apospóricas (Fig. 4). Em algumas dessas células foi possível determinar a presença de dois núcleos associados na micrópila e um vacúolo situado mais próximo à calaza, sugerindo a continuidade da diferenciação das iniciais apospóricas através de mitoses para a formação de sacos embrionários apospóricos do tipo *Panicum*.

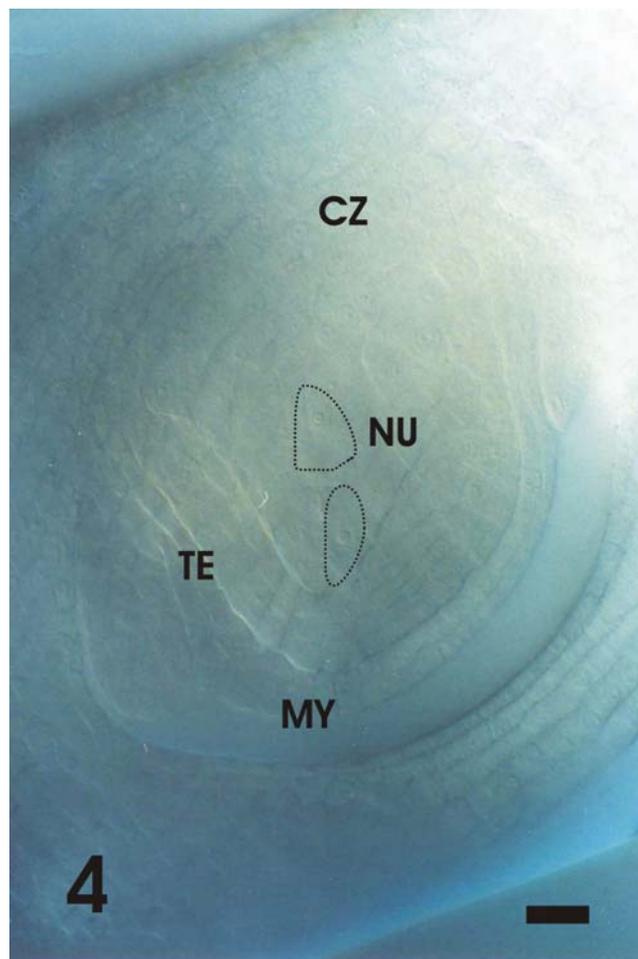


Figura 4: Fotomicrografia em DIC de ovário clarificado do acesso BRA003450 mostrando células iniciais apospóricas. Essas células possuem maior volume do que aquelas do nucelo (NU), parede celular espessa e núcleo bastante evidente. A inicial apospórica mais próxima a chalaza (CZ) apresenta dois núcleos resultantes da primeira mitose para formação do saco embrionário do tipo *Panicum*. Tegmentos (TE). Nucelo (NU). Barra correspondendo a 500 μm .

Em outros ovários contendo iniciais apospóricas, foi possível observar além do indicativo de degeneração dos megásporos, a presença do megásporo

sobrevivente em diferenciação, sugerindo que tanto saco embrionário do tipo *Polygonum* como do tipo *Panicum* seriam formados no mesmo óvulo.

Embrião multicelular foi observado em óvulos dos dois acessos (Fig. 5), sugerindo a ocorrência de embrionia precoce, característica em algumas plantas apomíticas.

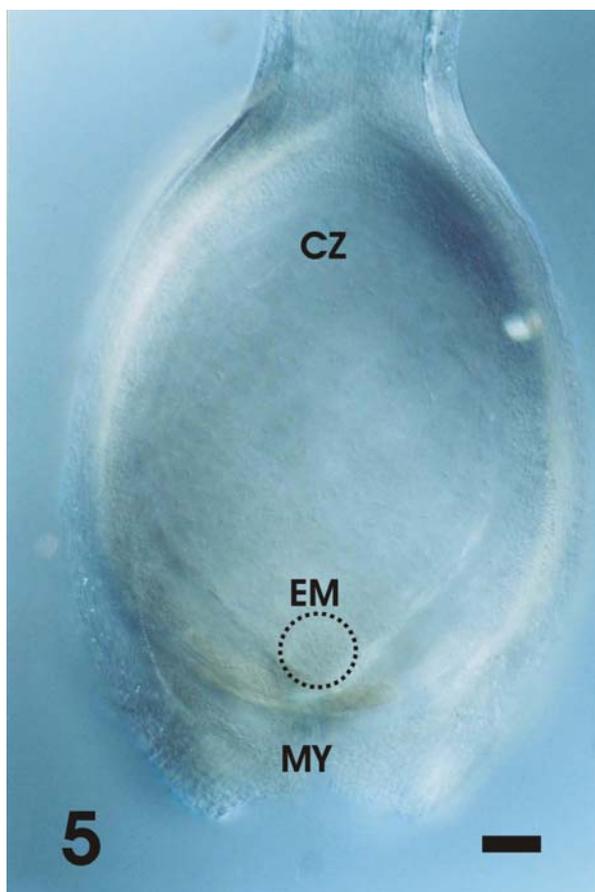


Figura 5: Fotomicrografia em DIC de ovário clarificado do acesso BRA002232 de *B. brizantha* mostrando três sacos embrionários em um mesmo óvulo. O saco embrionário próximo à micrópila é do tipo *Panicum* cujo núcleo polar (seta) da célula central está associado a um embrião multicelular. Tegumentos (TE). Nucelo (NU). Barra correspondendo a 500 µm.

A freqüência desses embriões foi maior no acesso BRA003450 (23%) do que em BRA002232 (8%), sendo que a maioria dos embriões observados em BRA003450 estava dentro de um saco embrionário situado mais próximo à calaza. Esses embriões estavam associados à célula central contendo um núcleo polar, sem indícios de formação do endosperma. Em apenas um óvulo de BRA002232 foi observado embrião e núcleos de endosperma em um saco embrionário próximo à micrópila. Também foram detectados embriões em sacos embrionários onde nem núcleo polar ou endosperma estavam

morfologicamente evidentes. No acesso BRA002232, o número de embriões encontrados em sacos embrionários situados mais próximo a calaza e à micrópila foi o mesmo: quatro. Esses resultados estão resumidos na tabela IV.

Tabela IV: Número de ovários das flores coletadas em antese no período de fevereiro a junho de 2003 dos acessos BRA002232 e BRA003450 de *Brachiaria brizantha* contendo embrião em saco embrionário posicionado mais próximo à micrópila ou calaza e o número de embriões associados a endosperma.

Localização do SE com embrião	Acessos	Número de ovários					
		fevereiro	março	abril	maio	junho	total
próximo à micrópila	BRA002232	02	0	02	0	ND	04
	BRA003450	01	02	ND	0	0	03
próximo à calaza	BRA002232	02	01	0	01	ND	04
	BRA003450	11	08	ND	02	0	21
Embrião com endosperma	BRA002232	01	0	0	0	ND	01
	BRA003450	0	0	ND	0	0	0

ND: não determinado.
SE: saco embrionário.

A taxa de fertilidade estimada em BRA002232 foi de 19% e de 32% em BRA003450. Apesar da alta frequência de múltiplos sacos embrionários em um mesmo óvulo nesses acessos, apenas um embrião foi observado após a escarificação de cariopses maduras e, portanto, a poliembrião não foi detectada.

Análises do cv. Marandu confirmaram que a maioria dos óvulos possui apenas um saco embrionário. Diferentemente das análises anteriores que mostraram que 2% dos ovários do cv. Marandu continham saco embrionário do tipo *Polygonum* (Araujo et al., 2000), nesse estudo, a frequência determinada foi de 13% e somente sacos embrionários do tipo *Panicum* foram observados na região próxima à micrópila. Aproximadamente 19% dos ovários continham embrião precoce e a taxa de fertilidade foi estimada em 30%.

Grãos de pólen aderidos à porção ramificada do estigma e tubos polínicos múltiplos com tampões de calose fluorescentes no estigma e ao longo do estilete dos pistilos foram observados nos três acessos 2h após a polinização.

DISCUSSÃO

O indicativo de apomixia facultativa em *Brachiaria* relatado na literatura (Valle, 1986, Valle, 1990, Lutts et al., 1994, Valle & Savidan, 1996, Dusi & Willemse, 1999, Araujo et al., 2000) baseia-se na ocorrência de saco embrionário do tipo *Polygonum*, associado ou não àqueles do tipo *Panicum* em um mesmo óvulo, em diferentes freqüências nos vários acessos apomíticos apospóricos do gênero. Entretanto, ainda não foi determinado se os sacos embrionários do tipo *Polygonum* presentes nos acessos apomíticos de *Brachiaria* podem ser fecundados e originar sementes viáveis através da sexualidade, o que caracterizaria de fato, a apomixia facultativa.

Visando identificar acessos de *Brachiaria* com características reprodutivas de interesse ao estudo da apomixia facultativa, a porcentagem de ovários contendo sacos embrionários do tipo *Polygonum* foi reavaliada em cinco acessos apomíticos que, durante observações preliminares, mostraram um elevado número desse tipo de saco embrionário⁶. Dentre esses que confirmaram a alta freqüência de sacos embrionários do tipo *Polygonum*, foram selecionados dois acessos de *B. brizantha*, BRA002232 e BRA003450 que apresentaram maior freqüência de sacos embrionários do tipo *Polygonum*. Paralelamente, o acesso apomítico BRA000591 de *B. brizantha*, o cv. Marandu foi analisado, pois essa é a planta utilizada em estudos conduzidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia sobre a apomixia. Esse acesso apresenta um baixo indicativo de apomixia facultativa (Araújo et al., 2000) e uma eficiente produção de sementes.

Análises confirmaram que mais da metade dos óvulos nos acessos BRA002232 e BRA003450 continham um ou mais sacos embrionários do tipo *Panicum* e que aproximadamente 42% continham saco embrionário do tipo *Polygonum*, na maioria associada à pelo menos um saco embrionário do tipo *Panicum*. A origem meiótica dos sacos embrionários tipo *Polygonum* bem como a origem apospórica dos sacos embrionários do tipo *Panicum* foram confirmadas por análises morfológicas através da observação do megásporo

⁶ Comunicação pessoal da Dra. C. B. do Valle, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte à pesquisadora Ana Claudia Guerra de Araújo, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em 17/07/2002.

calazal sobrevivente e de iniciais apospóricas, como anteriormente observado no acesso diplóide sexual de *B. brizantha*, BRA002747 e no cv. Marandu (Araujo et al., 2000).

Foi observado que a diferenciação das iniciais apospóricas ocorre na maioria das vezes, juntamente ao processo de degeneração dos megásporos, independentemente da sobrevivência ou não do megásporo calazal, assim como no cv. Marandu (Araújo et al., 2000). Esse é provavelmente um padrão para a espécie, que difere daquele observado em *B. decumbens*, onde normalmente as iniciais apospóricas se diferenciam antes ou logo após a formação dos megásporos reduzidos (Dusi & Willemse, 1999).

Com o objetivo de selecionar o acesso onde, em experimentos futuros, possamos realizar a fecundação controlada com maior facilidade, o acesso cuja porcentagem de sacos embrionários do tipo *Polygonum* situados próximo à micrópila é maior foi identificado. Isso porque a região da micrópila, por ser aquela por onde se dá a penetração do tubo polínico para o descarregamento dos gametas masculinos, é a posição mais favorável para fecundação de um saco embrionário. Além disso, essa também é a região onde ocorre um fluxo intenso de nutrientes para o saco embrionário e o embrião (Willemse & van Went, 1984).

Ainda visando experimentos de fecundação controlada, foi confirmado que os grãos de pólen são viáveis, o estigma é receptivo e que há um indicativo de autocompatibilidade nesses acessos. Essas análises foram comparadas com os padrões apresentados pelo cv. Marandu (Alves 2000), que é autocompatível. A indicação de autocompatibilidade se baseou nos parâmetros utilizados por Ndikumana (1985), que determinou que acessos sexuais de *Brachiaria* eram auto-incompatíveis devido ao pequeno número de grãos de pólen germinados e ao pequeno número de tubos polínicos mesmo antes da segunda hora após a autopolinização.

A fertilidade estimada em BRA003450 é similar àquela no cv. Marandu, cujo sucesso nas áreas de pastagens está garantido pela dispersão de sementes viáveis. No outro acesso, BRA002232, a fertilidade é menor, porém em uma taxa ainda apropriada para fins experimentais.

Considerando-se essas análises, BRA003450 será o acesso de *B. brizantha* onde posteriormente serão realizados experimentos visando a

indução de fecundação de saco embrionário tipo *Polygonum* tanto in vivo como in vitro e resgate de embriões.

No entanto, para se estudar a apomixia facultativa em *Brachiaria* deverão ser considerados alguns fatores como a freqüência de poliembrião e de embrião precoce. Baseado no grande número de iniciais apospóricas observadas nas plantas apomíticas apospóricas, a poliembrião deveria ser bastante comum nessas plantas. Mas as análises indicam que a poliembrião não é freqüente nos acessos apomíticos de *B. brizantha*. Talvez a embrião precoce, de origem autônoma (partenogênese) seja um fator alterando ou impedindo a fecundação e formação de outros embriões em um mesmo óvulo.

Além disso, para se verificar a formação de embrião zigótico em plantas apomíticas, além da necessidade de conhecimento sobre a gametogênese, aspectos da biologia da reprodução e embriogênese, ainda é necessária a utilização de estratégias que auxiliem na análise de segregação da progênie devido à dificuldade de se distinguir fenotipicamente e citogeneticamente a progênie zigótica daquela apomítica em plantas de *Brachiaria*. Possíveis estratégias aplicáveis na discriminação de progênies seriam o uso de gameta masculino contendo gene repórter ou ainda o uso de marcadores específicos para plantas apomíticas e sexuais como proposto em projeto da Embrapa.

Paralelamente, nesse projeto já estão sendo estabelecidas e otimizadas metodologias de fecundação in vivo, in vitro e transformação de *Brachiaria* que virão a auxiliar na determinação da ocorrência de apomixia facultativa em *B. brizantha*. Também poderão ser adotados procedimentos de resgate de embriões (Rodrigues-Otubo et al., 2000).

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Dra. C. B. do Valle, Embrapa Gado de Corte, CampoGrande, MS. Essa pesquisa foi financiada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. R. **Aspectos da reprodução em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. 2000. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T. C.; ARAUJO, A. C. G. Direct evidence of pseudogamy in an apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 14, p. 207-212, 2001.
- ARAUJO, A. C. G.; FALCÃO, R. **Observação de múltiplos sacos embrionários em ovário de plantas do acesso sexual de *Brachiaria brizantha* (Poaceae)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2003. 16 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 40).
- ARAUJO A. C. G.; MUKHAMBETZHANOV, S.; POZZOBON M. T.; SANTANA E. F.; CARNEIRO, V. T. C. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales - Le Botaniste**, Paris, Tome XXIII, p. 13-28, 2000.
- ARAUJO, A. C. G.; NOBREGA, J. M.; POZZOBON, M. T.; CARNEIRO, V. T. C. Evidence of sexuality in induced *Brachiaria brizantha* (Poaceae) tetraploid plants and their progeny. Submetido a revista **Euphytica**, em 2005^a.
- ASKER S. E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992. 298 p.
- BICKNELL, R. A.; KOLTUNOW, A. M. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. **Plant Cell**, v. 16, p. S228-S245, 2004.
- CARNAHAN H. L.; HILL H. D. Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. **American Journal of Botany**, Columbus, OH, v. 54, p. 253-253, 1958.
- DUSI, D. A.; ARAUJO, A. C. G.; CARNEIRO, V. T. C. Apomixia: reprodução assexual nas angiospermas. **UNIVERSA**, Brasília, v, 8, n. 1, p. 133-148, 2000.
- DUSI, D. A. A.; WILLEMSE, M. T. M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Biologica Cracoviense Society Botany**, v. 41, p. 151-162, 1999.
- KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell**, v. 5, p. 1425-1437, 1993.
- KOLTUNOW, A. M. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiology**, Bethesda, MD, v. 108, p. 1345-1352, 1995.

KOLTUNOW, A. M.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review Plant Biology**, v. 54, p. 547-574, 2003.

LAKSHMANAN, K. K.; AMBEGAOKAR, K. B. Polyembryony. In: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 445-474.

LUTTS S.; NDIKUMANA J.; LOUANT, B. P. Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F1 hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 78, p. 19-25, 1994.

MARTIN, F. W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology**, Baltimore, MD, v. 34, p. 125-128, 1959.

NDIKUMANA, J. **Étude de l'hybridation entre espèces apomictiques et sexuées dans le genre *Brachiaria***. Louvain-la-Neuve. 1985. 210 f. Thèse (Doctorat) - Université de Louvain, Louvain, Belgique.

NGENDAHOYO, M. **Mecanismos de la reproducción dans le genre *Brachiaria* Gris. et strategies d'amélioration et de selection**. 1988. 165 f. Thèse (Doctorat) - Laboratoire de Phytotechnie Tropicale et Subtropicale, Faculté des Sciences Agronomiques Université Catholique de Louvain, Louvain, Belgique.

NOGLER, G. A. Gametophytic apomixis. In JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 475-518.

REISER L.; FISCHER, R. L. The ovule and the embryo sac. **Plant Cell**, v. 5, p. 1291-1301, 1993.

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do. KUMBLE, V. (Ed.). ***Brachiaria*: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT/Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1996. p. 16-42. (CIAT. Publication, 259).

RODRIGUES-OTUBO, B. M., PENTEADO, M. I. de O.; VALEE, C. B. do. Embryo rescue of interspecific hybrids of *Brachiaria* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 61, p. 175-182, 2000.

SAVIDAN Y. Apomixis: genetics and breeding. **Plant Breeding Reviews**, Westport, Conn., v. 18, p. 13-86, 2000.

VALLE, C. B. do. **Cytology, mode of reproduction and forage quality of selected species of *Brachiaria* Griseb**. 1986. 90 f. Thesis (Ph. D.) - University of Illinois, Illinois.

VALLE C. B. do. **Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético**. Campo Grande, MS: Embrapa –CNPGC, 1990. 33 p. (Embrapa –CNPGC. Documentos, 46).

VALLE C. B. do; GLIENKE C. New sexual accessions in *Brachiaria*. **Apomixis Newsletter**, v. 3, p. 11-13, 1991.

VALLE C. B. do; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do. KUMBLE, V. (Ed.). ***Brachiaria***: biology, agronomy, and improvement. Cali: CIAT; Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1996. p. 147-163. (CIAT. Publication, 259).

WILLEMSE, M. T. M.; VAN WENT, J. L. The female gametophyte. In: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 159-191.