

Este exemplar corresponde a reduções feitas da tese
defendida pela candidata Iara Cândida Crepaldi
e aprovada pela comissão julgadora.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS


21/10/87.

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO EM *MANIHOT* MILL.

IARA CÂNDIDO CREPALDI

ORIENTADOR: PROF.DR. GEORGE JOHN SHEPHERD

Tese de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Biolo
gia Vegetal da Universidade Es-
tadual de Campinas - São Paulo.

C863b

8866/BC

1 9 8 7

AGRADECIMENTOS

Registro aqui a minha gratidão a algumas instituições e a alguns profissionais que deram a sua parcela de contribuição para concluir este trabalho:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): pelas diversas categorias de bolsa;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) : pelo auxílio financeiro na etapa final do trabalho;
- Prof. Dr. George John Shepherd, Departamento de Botânica - Universidade Estadual de Campinas: que na qualidade de Orientador, discutiu os manuscritos, auxiliou nas fotomicrografias e no "Summary";
- Enga. Agrônoma Tereza Losada Valle, Seção de Raízes e Tubérculos - Instituto Agronômico de Campinas: pelas sugestões quando da leitura do rascunho da tese;
- Seção de Raízes e Tubérculos do Instituto Agronômico de Campinas: pelo espaço físico para a execução dos trabalhos e outras facilidades;
- Biblioteca do Instituto Agronômico de Campinas, com ênfase à Sra. Neide Zamariolli e Biblioteca do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, com ênfase à Sra. Ana Gagliardi: pela presteza do atendimento e conferência da bibliografia consultada;
- Seção de Climatologia do Instituto Agronômico de Campinas: pelos dados referentes a volume de chuva e temperatura média;
- Comissão que realizou a leitura crítica da tese na fase de pré-banca, com posta pelos docentes: Profa. Dra. Neusa Taroda, Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); Prof. Dr. Reinaldo Monteiro, Departamento de Botânica da Universidade Estadual "Julio de Mesquita Filho" de Rio Claro (UNESP); Prof. Dr. Paulo Soderro Martins, Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" de Piracicaba (USP);
- Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, pelo interesse nesse trabalho e concessões e, com ênfase, ao Prof. Luciano Paganucci de Queiroz pelas citações dos nomes dos autores das espécies;
- Um rol de outros profissionais que mais indiretamente me auxiliaram e que não estão aqui mencionados, a certeza que os tenho em memória.

C O N T E Ú D O

	Pág.
RESUMO	i
SUMMARY	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. O Gênero <i>Manihot</i> Mill.	3
2.1.1. Taxonomia	3
2.1.1.1. Taxonomia de <i>Manihot esculenta</i> Crantz	7
2.1.2. Citologia	9
2.1.3. Origem, Geografia e Ecologia	13
2.2. Sistemas Reprodutivos	19
2.2.1. Introdução	19
2.2.2. Importância	20
2.2.3. Tipos Principais	21
2.2.4. Evolução e Ocorrência dos Sistemas Reprodutivos	22
2.2.4.1. Reprodução Sexuada	23
2.2.4.2. Reprodução Assexuada	26
2.2.5. Sistemas de Reprodução na Vegetação Tropical	27
2.2.6. Vantagens Evolutivas e Ecológicas	32
2.2.7. Ocorrência dos Sistemas Reprodutivos em Euphorbiaceae e em <i>Manihot</i>	42
2.3. Barreiras Interespecíficas em <i>Manihot</i>	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Material Vegetal	47
3.2. Métodos	48
3.2.1. Estabelecimento de um Campo de Cultivares	48
3.2.2. Replântio do Campo de Cultivares	48
3.2.3. Estabelecimento da Coleção de Espécies Selvagens	49
3.2.4. Fenologia	49
3.2.5. Estudo do Horário de Abertura das Flores Masculinas e Femininas	51

3.2.6. Teste para Agamospermia	52
3.2.7. Polinizações	53
3.2.8. Coleta de Material	54
3.2.9. Fixação do Material	56
3.2.10. Crescimento do Tubo Polínico	57
3.2.11. Preparo de Lâminas	57
3.2.11.1. Lâminas Temporárias	57
3.2.11.2. Lâminas Permanentes	59
3.2.12. Medida dos Grãos de Pólen	60
3.2.13. Contagem de Grãos de Pólen por Verticilo . . .	60
3.2.14. Identificação da Substância de Reserva	61
4. RESULTADOS	62
4.1. Florescimento	62
4.1.1. Horário de Antese das Flores	62
4.1.2. Número de Flores Masculinas e Femininas por Inflorescência	68
4.1.3. Ciclos de Florescimento	69
4.2. Polinizações Experimentais	76
4.3. Teste para Agamospermia	77
4.4. Microsporogênese	81
4.4.1. Estudo do Grão de Pólen	94
4.5. Megasporogênese e Megagametogênese	98
4.6. Observações Histológicas em Ovários Polinizados	103
4.7. Germinação do Tubo Polínico	103
4.8. Estudos Histológicos em Ovários Polinizados . . .	104
4.9. Clarificação dos Óvulos	110
4.10. Acúmulo de Substância de Reserva no Nucelo e no Saco Embrionário	110
5. DISCUSSÃO.	112
5.1. Fenologia e Barreiras Interespecíficas	112
5.1.1. Cruzamentos Interespecíficos	126
5.2. Sistemas Reprodutivos	128
5.2.1. Cruzamentos Intraespecíficos	132
5.3. Citologia e Embriologia	133
5.3.1. Microsporogênese	133
5.3.2. Megasporogênese e Megagametogênese	139
6. CONCLUSÕES	147
7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	148

INDICE DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Pág.</u>
1. <i>M. tripartita</i> : Horário de Antese	63
2. <i>M. pilosa</i> : Horário de Antese	63
3. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Horário de Antese	64
4. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Horário de Antese	64
5. <i>Manihot</i> spp.: Número de Flores Masculinas e Femininas e Relação Flor Masculina por Flor Feminina	68
6. <i>Manihot</i> spp.: Número de Inflorescências por Planta	71
7. Volume de Chuvas e Temperatura Média em Três Ciclos de Florescimento	71
8. <i>Manihot</i> spp.: Número de Inflorescências por Planta por Mês	71
9. <i>Manihot</i> spp.: Taxas de Obtenção de Frutos, Ovários Desenvolvidos e Sementes	78
10. <i>Manihot</i> spp.: Teste para Agamospermia	79
11. <i>Manihot</i> spp.: Comportamento quanto à Agamospermia	80
12. <i>Manihot</i> spp.: Número de Células Observadas por Etapa de Divisão Meiótica	84
13. <i>Manihot</i> spp.: Taxa de Viabilidade Masculina	94
14. <i>Manihot</i> spp.: Diâmetro dos Grãos de Pólen	96
15. <i>Manihot</i> spp.: Número de Grãos de Pólen por Antera Relacionado e Não Relacionado ao Verticilo do Estame	97
16. <i>Manihot</i> spp.: Relação entre Número de Grãos de Pólen e Número de Óvulos por Inflorescência	98
17. <i>M. esculenta</i> 'Taquari' e <i>M. pilosa</i> : Estágios de Desenvolvimento do Gametófito Feminino	100
18. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Análise do Saco Embrionário em Óvulos Não Polinizados com Um e Seis Dias Após a Antese	103
19. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Análise do Saco Embrionário em Óvulos Polinizados	109

INDICE DE FIGURAS

<u>Fig.</u>	<u>Pág.</u>
1. <i>M. pilosa</i> : Horário de Antese	66
2. <i>M. tripartita</i> : Horário de Antese	67
3. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Horário de Antese	67
4. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Horário de Antese	67
5. <i>M. pilosa</i> : Média de Inflorescência por Planta em Três Ciclos de Florescimento	72
6. <i>M. tripartita</i> : Média de Inflorescência por Planta em Três Ciclos de Florescimento	72
7. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Média de Inflorescência por Planta em Três Ciclos de Florescimento	73
8. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Média de Inflorescência por Planta em Três Ciclos de Florescimento	73
9. <i>Manihot</i> spp.: Tendência do Florescimento	75
10. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Corte Transversal do Botão Masculino	85
11. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Detalhe das Anteras	86
12. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Detalhe do Microsporângio	86
13. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Célula Dupla em Paquíteno	87
14. <i>M. tripartita</i> : Paquíteno	87
15. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Diacinese	88
16. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Metáfase I	88
17. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Anáfase I	89
18. <i>M. pilosa</i> : Tétrade de Micrósporos	89
19. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Corte Transversal do Botão Masculino	90
20. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Antera Madura	90
21. <i>M. tripartita</i> : Grãos de Pólen Liberados	91
22. <i>M. tripartita</i> : Detalhe de um Microsporângio	92
23. <i>M. tripartita</i> : Detalhe do Endotécio	92
24. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Endotécio Espiralizado	92

25. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Célula do Tapete em Divisão	93
26. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Micrôsporos Formados e Células do Tapete Incólumes	93
27. <i>M. tripartita</i> : Média de Grãos de Pólen	95
28. <i>M. pilosa</i> : Média de Grãos de Pólen	95
29. <i>M. esculenta</i> 'Branca de Santa Catarina': Média de Grãos de Pólen	95
30. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Média de Grãos de Pólen	95
31. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Esquema de um Óvulo	101
32. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Aspecto Geral do Óvulo Completo	101
33. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Camada de Células	101
34. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Gametófito Monospórico	101
35. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Saco Embrionário de Botão Feminino Pequeno	102
36. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Saco Embrionário de Botão Feminino com um dia após a Antese	102
37. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Saco Embrionário de um Óvulo Médio em Final de Mitose	102
38. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Saco Embrionário de um Óvulo Médio na Última Etapa da Megasporogênese	102
39. (A,B,C) <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Gametófito Oito-nucleado	102
40. (A, B) <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Passagem do Tubo Polínico pelo Estilete	105
40. (C, D) <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Entrada do Tubo Polínico na Micrôpila e Saco Embrionário	106
41. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Tubo Polínico no Saco Embrionário	107
42. (A, B) <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Saco Embrionário com 48 horas de Polinização	108
43. (A, B) <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Saco Embrionário com 48 horas de Polinização, Presença do Gameta Masculino	108
44. (A,B,C,D,E) <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Saco Embrionário com 72 horas de Polinização	109
45. <i>M. esculenta</i> 'Taquari': Presença de Amido no Núcleo	111

R E S U M O

Foram investigadas duas espécies selvagens de *Mannihot*: *M. tripartita* e *M. pilosa* e duas espécies de *M. esculenta* : cv. Branca de Santa Catarina e cv. Taquari.

Embora tenha sido limitado o número de plantas disponíveis para os experimentos, os resultados obtidos sugerem a presença de barreiras reprodutivas externas (pré-polinização) e internas (pós-polinização) entre as espécies selvagens e cultivadas. No primeiro caso, dois tipos foram detectados: sazonal - com diferenças concernentes ao período de florescimento, e diária (diurna/noturna), com diferenças relativas à liberação do pólen e receptividade do estigma. No segundo caso, houve evidências de aloincompatibilidade, envolvendo interações pólen-pistilo (pré-zigótica) ou inviabilidade da semente (pós-zigótica). Como essas barreiras são incompletas, o fluxo gênico se torna difícil, porém não é totalmente impedido.

Em termos de sistema reprodutivo, *M. tripartita* parece ser auto-incompatível, tem alta proporção de pólen/óvulo e grande número de grãos de pólen por antera, se comparada com as outras espécies.

As evidências de agamospermia são limitadas no cv. Branca de Santa Catarina, mas a frequência desse fenômeno parece ser bem baixa, e as sementes ocasionalmente formadas podem ser resultados de contaminação e não de agamospermia. A partenocarpia também foi detectada e é muito mais frequente e mais amplamente distribuída que a agamospermia.

A microsporogênese foi normal, com citocinese simultânea. Na meiose, houve a formação de 18 bivalentes e nenhuma anormalidade foi detectada. No cv. Branca de Santa Catarina, contudo, a esterilidade da flor estaminada foi causada pela degenerescência das células do tapete, as quais permanecem intactas, ao invés de degenerarem, como é usual.

A megasporogênese e a megagametogênese são normais, do tipo "Polygonum", com um saco embrionário monospórico 8-nucleado. Foi difícil a observação do saco embrionário, devido à presença de grãos de amido no nucelo, o que tornou impossível o uso de técnicas de clarificação.

S U M M A R Y

Phenology, reproductive system, cytology, and embryology were investigated in two species of *Manihot* (*M. tripartita* and *M. pilosa*) and two varieties of *M. esculenta* (cv. Branca de Santa Catarina and Taquari).

Although the number of plants available for testing was limited, the results obtained suggest the presence of external (pre mating) and internal (post mating) reproductive barriers between the wild species and between the wild species and the cultivated one. In the first case, two kinds of temporal divergence were detected: seasonal — with differences in flowering periods, and diurnal, with differences in pollen presentation and stigma receptivity. In the second case, there was evidence for cross-incompatibility, involving either pollen-pistil interactions (prezygotic) or seed inviability (post-zygotic). As these barriers are incomplete, they make gene flow difficult, but do not completely prevent it.

With regard to reproductive systems, *M. tripartita* appears to be self-incompatible, and has a higher pollen ovule ratio and a larger number of pollen grains per anther than the other species.

There is limited evidence for the occurrence of agamospermy in cv. Branca de Santa Catarina, but the frequency of this phenomenon appears to be very low, and the occasional seeds formed may be the result of contamination and not agamospermy. Parthenocarpy was also detected, and is much more

frequent and more widely distributed than agamospermy.

Microsporogenesis was normal, with simultaneous cytokinesis. In meiosis, 18 bivalents were observed and no abnormalities were detected. In cv. Branca de Santa Catarina, however, male sterility appears to be caused by a failure in the degeneration of the tapetal cells, which remain intact instead of degenerating, as is normally the case.

Megasporogenesis and megagametogenesis are normal, and are of the "Polygonum" type, with a monosporic, 8-nucleate embryo sac. Observation of the embryo sac details was difficult because of the presence of starch grains in the nucellus, which made it impossible to use clarification techniques.

1. INTRODUÇÃO

Manihot esculenta Crantz, a mandioca, é uma das 98 espécies atualmente reconhecidas no gênero *Manihot* (Euphorbiaceae). Desde as civilizações pré-colombianas é ela utilizada como alimento. Em virtude dos regionalismos, há diversas maneiras de consumo da raiz e das folhas. Além do uso na alimentação humana e animal, o amido da mandioca tem aplicações industriais.

Nas diversas instituições de pesquisa agrícola, o programa de melhoramento genético da mandioca é mais ou menos redundante, voltado principalmente para cruzamentos intervarietais, visando o aumento da resistência à bacteriose e concentração de amido por raiz, e a diminuição do ácido cianídrico das folhas. Tal melhoramento tem caminhado de forma lenta e com resultados pouco satisfatórios. Esses programas devem, sem dúvida, prosseguir, mas também precisaria atender-se para as demais espécies, dotadas de grande variabilidade genética, e desenvolver uma linha sólida de pesquisas em termos de hibridação interespecífica e, também, estudar os híbridos naturais existentes. Isso só seria possível com a compreensão do sistema reprodutivo de cada espécie, para conhecer os padrões de fluxo gênico, fundamental para entender a especiação e as diferenciações genéticas intra e inter-populacionais.

Outro ponto de carência sobre *Manihot* é a inconsistência das publicações nas áreas básicas, como Botânica, Citologia, Embriologia e Genética e, ainda, o fato de muitas delas serem em língua portuguesa, o que dificulta a sua divulgação. Trabalhos sobre embriologia no gênero, feitos por SCHÜRHOFF (1924) apud GIOELLI (1933) e GRANER (1935), apesar de

irrepreensíveis, tornaram-se limitados em citações de seus próprios autores e, com o passar do tempo, caíram no esquecimento. Tanto isto é verdade que, assuntos que versam sobre embriologia de plantas de importância econômica, como o de PRAKASH (1979), ou que tratam sobre embriologia e taxonomia, como os de MAHESHWARI (1950) e DAVIS (1966), respectivamente, desconhecem esses trabalhos existentes em *Manihot*.

Em virtude da escassez da pesquisa no gênero, e da falta de divulgação da pesquisa existente e, ainda, devido à idéia corrente de que a coincidência do período de florescimento entre as espécies do gênero e a posição geográfica das mesmas facilita a hibridação interespecífica, a proposta deste trabalho é explorar aspectos da reprodução nas espécies *M. tripartita*, *M. pilosa* e *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' e 'Taquari'.

Sobre a reprodução, foram estudados os seguintes aspectos: sistemas de polinização (autopolinização e polinização cruzada); agamospermia; embriologia (megasporogênese e megagametogênese e observações histológicas em ovários polinizados); citologia (microsporogênese); tamanho dos grãos de pólen; número de grãos de pólen por antera; média de grãos de pólen necessária para fertilizar cada óvulo; fenologia (horário de antese das flores, número de flores masculinas e femininas por inflorescência e ciclos do florescimento) e, com isso, realizar estudos mais apurados sobre barreiras de isolamento entre as espécies de *Manihot*, o que até então não havia sido feito, além de trazer à tona a literatura há muito esquecida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Gênero *Manihot* Mill.

2.1.1. Taxonomia

O gênero *Manihot* pertence à família Euphorbiaceae, constituída por cerca de 283 gêneros e aproximadamente 7300 espécies. As Euphorbiaceae são caracterizadas por apresentar flores unissexuais, ovário súpero e trilocular, placentação axilar, óvulos colaterais, pêndulos com rafe ventral e micrôpila com carúncula (LAWRENCE, 1971; JOLY, 1976). Devido à grande diversidade de substâncias químicas, as Euphorbiaceae incluem um grande número de plantas de importância econômica: *Hevea* Aubl. (borracha); *Aleurites* Forst., *Ricinus* (Tourn.) L., *Croton* L. e *Jatropha* L. (Óleo); *Manihot* Mill. (amido) e *Aleurites* Forst., *Sapium* P.Br. e *Euphorbia* L. (cera) (WEBSTER, 1967).

A família Euphorbiaceae é de difícil delimitação e, com isso, torna-se complexo reconhecer as suas afinidades com outros grupos. Face à grande variação morfológica, muitos autores sugerem que ela seja polifilética em origem. Assim, essa diversidade floral e vegetativa proporcionou o surgimento de várias escolas entre os taxonomistas, questionando o seu reconhecimento como grupo natural (WEBSTER & ELLIS, 1962). BAILLON (1858) apud WEBSTER (1967) sugeriu uma relação tetraédrica para a afinidade das Euphorbiaceae com outras famílias: em uma das faces do tetraedro estariam as Euphorbiaceae e nas outras faces, estariam as Malvales, Geraniales, Rutales e Rhamnales.

PAX (1925) apud WEBSTER (1967), por sua vez, preferiu a família como tendo origem difilética, com parte de seus ancestrais no complexo Geraniales-Sapindales e parte nas Malvales. Quanto à ordem Malvales, CROIZAT (1949) apud WEBSTER (1967), enfatizou a afinidade das Euphorbiaceae com a família Sterculiaceae. ERDTMAN (1952) apud WEBSTER & ELLIS (1962), valendo-se de estudos palinológicos, sugeriu uma possível relação da família com Buxaceae e Thymelaceae. HUROSAWA (1954) apud WEBSTER & ELLIS (1962), propôs a divisão da família em quatro famílias e, foi sugerida por HUTCHINSON (1959) apud WEBSTER & ELLIS (1962), a derivação da família em no mínimo quatro ordens diferentes: Bixales, Tiliales, Malvales e Celastrales.

WEBSTER (1975) propôs uma classificação para a família Euphorbiaceae, dividindo-a em cinco subfamílias, apresentadas a seguir: Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae. Na subfamília Crotonoideae, tribo Manihoteae, temos o gênero *Manihot*, neotropical, com plantas grandes, raramente arborescentes, geralmente herbáceas, lenhosas, tuberosas, muitas vezes glabras e esverdeadas; folhas alternas, espaçadas no caule, muitas vezes longo-pecioladas, biestipuladas; limbo profundamente dividido, palmado; inserção do pecíolo basal ou peltada. Inflorescência com muitas flores; pétalas ausentes; flores masculinas no ápice da inflorescência, tépalas em número de 5, unidas até a metade do seu comprimento; estames geralmente 10 (algumas vezes 8), em dois verticilos; o filete é longo e delgado, sustenta uma antera versátil com duas tecas com deiscência longitudinal. O disco das flores masculinas é lobado, com os estames entre os lobos. Há variação entre as flores em relação a tamanho e pubescência. Flores femininas na base das inflorescências, tépalas livres, pentâmeras, geralmente linear, ápice agudo, variando de glabras a pubescentes. O disco é liso, não lobado. Ovário tri-carpelar, tri-ocular, com um óvulo anátropo e pêndulo por lóculo. O estigma tri-lobado é sésil. A forma e o tamanho das flores femininas são bem uniformes entre as espécies. O fruto é cápsula com deiscência septicida e (geralmente) loculicida; superfície lisa, às vezes mais ou menos proeminente, tri-alada; a forma varia de ovóide a elipsóide. Semente carunculada, variando em dimensão e forma (MUELLER ARGOVENSIS, 1874; ROGERS & APPAN, 1973).

BAUHIN (1651), citado por ROGERS & APPAN (1973) , foi quem primeiro reconheceu e descreveu o termo genérico *Manihot*. Ele estudou as plantas coletadas por André Thevet no Brasil e as designou por *Manihot theveti*, hoje conhecidas por *Manihot esculenta*. LINNAEUS (1753) apud ROGERS & APPAN (1973) colocou as espécies de *Manihot* conhecidas na época, no gênero *Jatropha* L. e designou as espécies de *Jatropha manihot*. Isso causou grande confusão nomenclatural, mas MILLER & WEBSTER (1962), citado por ROGERS & APPAN (1973), claramente separaram os dois gêneros através do perianto. *Manihot* possui perianto com um verticilo, enquanto *Jatropha* o possui com dois verticilos. Outro gênero bastante afim de *Manihot* é *Cnidosculus* Pohl, sendo que ambos possuem perianto com um verticilo. Entretanto, o conhecimento sobre *Cnidosculus* nos dias atuais ainda é escasso para maiores considerações (ROGERS & APPAN, 1973). MILLER & WEBSTER (1962) apud WEBSTER (1967) ainda assinalaram que o gênero mais próximo de *Manihot* é *Cnidosculus*.

A primeira descrição válida para o gênero foi feita por MILLER (1754) apud ROGERS & APPAN (1973), na 4a. edição do "Gardner's Dictionary", mas só em 1763 ele foi reconhecido como autor do gênero, o que até então era atribuído a M. Adanson. CRANTZ (1766) apud ROGERS & APPAN (1973) no "Institutiones Rei Herbariae", fez a primeira publicação válida para a espécie de *Manihot*, e publicou o epíteto *M. esculenta* para o cultígeno.

Pohl fez a primeira monografia do gênero no "Plantarum Brasiliae Icones et Descriptions" e dividiu o cultígeno em duas espécies: *M. utilissima* Pohl (mandioca amarga) e *M. aipi* Pohl (mandioca doce), com base, portanto, nas diferenças de concentração de ácido cianídrico, como foi reconhecido mais tarde por ROGERS & APPAN (1973). Contudo, a subdivisão da espécie *M. esculenta* com duas categorias: amarga (*M. utilissima*) e doce (*M. aipi*), é apenas uma subdivisão cultural e química, baseada no grau de toxicidade das raízes (RENVOIZE, 1972), e essa subdivisão, na opinião de CIFERRI (1938, 1942), citado por ROGERS (1963), não tem valor taxonômico. PAX (1910) fez uma monografia do gênero e reconheceu 128 espécies distribuídas por 11 seções e, mais recentemente, ROGERS & APPAN (1973) publicaram uma monografia bastante completa para o gênero e m

questão, baseando-se em estudos biosistemáticos, como também em caracteres morfológicos, e destacaram que para *Manihot* não deve ser abandonada a taxonomia tradicional, especialmente em relação aos caracteres vegetativos. Esses autores reconheceram para *Manihot*, além da espécie *M. esculenta*, mais 97 espécies, distribuídas em 19 seções: *Heterophyllae*, *Quinquelobae*, *Graciles*, *Sinuatae*, *Glaziovianae*, *Peruvianae*, *Crotalarieformis*, *Stipulares*, *Grandibracteatae*, *Brevipetiolatae*, *Peltatae*, *Tripartitae*, *Caerulescens* (todas brasileiras) e mais: *Manihot*, *Parvibracteatae*, *Foetidae*, *Anisophyllae*, *Carthaginensis*, *Variifoliae*, distribuídas por outros países tropicais.

Dessas seções, a *Heterophyllae* é a seção melhor representada no Estado de São Paulo e parece reunir as espécies mais recentes em origem. Talvez por isso não tenha representantes no Brasil Central.

ALLEM (1980) deteve-se no estudo de algumas espécies da seção *Heterophyllae* e sugeriu a possibilidade de *M. grahami* Hook. e *M. janiphoides* Müll. Arg. serem sinônimos e ROGERS & APPAN (1973), embora não as considerem como sinônimo, alertam para o fato de que na análise dos resultados feita por taxonomia numérica, essas duas espécies foram as que mais se aproximaram. ALLEM (1980) também coloca como sinonímia de *M. jolyana* Cruz a espécie *M. handroana* Cruz (CRUZ, 1965, 1967).

Apesar de a taxonomia não ser o propósito deste trabalho, pode-se verificar que é necessário que se faça uma revisão no gênero, o que possivelmente fará aumentar as sinonímias, principalmente na seção *Heterophyllae*. Um dos fatores responsáveis para isso é, sem dúvida, o fato dessa seção abrigar espécies mais ou menos recentes. Isso já pode ter algum respaldo, uma vez que NASSAR (1986) descreveu a espécie *M. neuzana* com ocorrência no Estado do Paraná e, com estudos de eletroforese em proteína da semente, colocou essa espécie na seção *Heterophyllae*, pela sua grande semelhança com *M. pohlii* Wawra (GRATTA PAGLIA et al., 1987).

2.1.1.1. Taxonomia de *Manihot esculenta* Crantz

O epíteto válido para designar a espécie cultivada do gênero *Manihot* foi proposto por CRANTZ (1766) apud ROGERS & APPAN (1973), reconhecido por CIFERRI (1938) apud ROGERS & APPAN (1973). Talvez, devido à não existência de regras de nomenclatura nessa época, POHL (1827) apud RENVOIZE (1972), designou, com base na concentração do ácido cianídrico, duas espécies, para indicar as diferenças entre os dois cultivares de *M. esculenta*. Dessa forma, receberam a denominação de *M. utilissima* Pohl, as variantes que possuíam alto teor desse ácido e *M. aipi* Pohl, as variantes que possuíam baixo teor dessa substância (RENVOIZE, 1972; ROGERS & APPAN, 1973; ROGERS & FLEMMING, 1973). MUELLER ARGOVIENSIS (1866) apud ROGERS & FLEMMING (1973) manteve a espécie *M. utilissima*, mas incluiu *M. aipi* como uma variedade de *M. palmata* Vellozo. PAX (1910) também manteve a designação de *M. utilissima*, mas colocou a espécie *M. aipi* como uma variedade de *M. dulcis* J.F.Gmelin. *M. aipi*, *M. dulcis* e *M. utilissima* foram colocadas como sinônimo de *M. esculenta* (ROGERS & APPAN, 1973).

Nas plantas cultivadas, em muitos casos, os caracteres são bem descontínuos, como por exemplo, a cor nas pimentas e nos grãos do minho. Às vezes, porém, a seleção natural é minimizada pelo fato do homem exercer uma contra-pressão sobre essa seleção natural, no sentido de manter as características desejadas, havendo uma aparente intergradação, o que impede uma delimitação clara das variantes cultivadas. No gênero *Manihot*, essa situação torna-se um agravante, pois poucas espécies cultivadas têm tantas espécies selvagens no mesmo gênero, como neste em questão (ROGERS, 1957; ROGERS, 1963, ROGERS & APPAN, 1973; ROGERS & FLEMMING, 1973). Assim, a taxonomia nessa situação é um tanto dificultada, pois, em muitos casos, a separação das espécies só é baseada em termos de propriedades bioquímicas.

Segundo ROGERS & FLEMMING (1973), todo grupo de plantas cultivadas tem uma classificação informal, geralmente baseada em um ou dois caracteres evidentes. Estes autores ten-

taram, com a espécie *M. esculenta*, descobrir se pode haver alguma correlação entre as várias características que podem ser utilizadas na classificação dos diversos cultivares, pois a taxonomia de *M. esculenta* até então, só teve valor histórico, ou seja, houve uma sucessão de datas, as quais registraram sugestões, mas nenhuma teve valor prático, nada de concreto foi atingido para avanços na taxonomia. Isso deveu-se, em muito, ao fato de haver poucas informações sobre a variação que se tem em relação à forma da folha, coloração do pecíolo, coloração do caule, enfim, dos caracteres vegetativos, sendo que a documentação de herbário disponível atualmente, é mais rica em detalhes sobre as características das inflorescências e dos frutos.

Na classificação proposta por ROGERS & FLEMMING (1973), as denominações subespecíficas básicas utilizadas na taxonomia das espécies selvagens foram abolidas: subespécie, variedade e forma. Os autores passaram a utilizar apenas dois termos para designar os cultivares: (1) divisão, a qual divide todos os cultivares de *M. esculenta* em duas partes principais; (2) grupo, que deve pertencer a uma ou outra divisão. Um grupo é uma seqüência de cultivares com grandes similaridades entre os pares. Essa seqüência de cultivares formando uma graduação morfológica, recebeu o nome de gradiente, e os autores enfatizam que esse termo não tem a conotação geográfica como a palavra "cline".

O princípio taxonômico proposto por ROGERS & FLEMMING (1973), baseado em métodos taximétricos, é para reunir os cultivares em grupos com maior similaridade. O princípio de toda a similaridade, além de fornecer uma melhor visão do conteúdo gênico do cultivar, também minimiza o efeito de um único caráter, o qual pode não refletir a afinidade natural dos cultivares. Então, o caráter que tem um maior número de estados conduz a um maior número de informações e passa a ser de mais utilidade na classificação. Os caracteres eleitos por ROGERS & FLEMMING (1973) foram:

- raiz : tipo de película; cor da película; cor da polpa
- caule : comprimento; ramificação da planta
- folha : número de lobos; forma do lobo; sinuosi-

dade dos lobos; comprimento do lobo mediano; largura do lobo mediano; cor do pecíolo; cor da folha jovem.

Com base nesses caracteres, ROGERS & FLEMMING (1973) montaram uma coleção de 228 amostras de população de cultivares de *M. esculenta*, coletados nos seguintes países: Jamaica, Costa Rica, Nicarágua, Brasil, Bolívia, Peru e países andinos. Os cultivares foram separados em 19 grupos e dentro de cada grupo, populações procedentes de diferentes países foram interconectadas.

2.1.2. Citologia

Entre o grande rol de famílias de angiospermas desconhecidas ou pouco conhecidas citologicamente, está a família Euphorbiaceae, em que menos de 5% de aproximadamente 7000 espécies têm sido examinadas no aspecto citológico (HANS, 1973; RAVEN, 1975). Todas as contagens de cromossomos efetuadas em espécies de *Manihot* ou em cultivares de *M. esculenta*, revelam que invariavelmente elas possuem 36 cromossomos (GRANER 1935, 1940, 1941; CRUZ, 1968; MAGOON et al., 1968; PURSEGLOVE, 1968; SOHMER, 1968; UMANAH & HARTMANN, 1973; JENNINGS, 1976; NASSAR, 1978b).

Os citologistas que trabalham com *Manihot* têm opiniões divergentes quanto ao nível de ploidia no gênero. GRANER (1935), o primeiro a determinar o número cromossômico da mandioca, a considerou diplóide, com 36 cromossomos somáticos. Essa suposição de Graner foi devido ao pareamento regular na meiose e, talvez, pelo fato do autor em questão ter se influenciado com outros experimentos que conduzia, onde constatou segregação de 3 : 1 de dois genes marcadores (GRANER, 1942a), mas desde 1941 o autor levanta a possibilidade de a mandioca ser um auto- ou alopoliplóide.

JENNINGS (1963) disse que, considerando o número cromossômico de outros gêneros de Euphorbiaceae e, considerando que *Manihot esculenta* tem 36 cromossomos, além dos estudos da meiose, há sugestão de que ela seria um alopoliplóide.

PERRY (1943) considerou o gênero como tetraplóide, e citou que não seria surpresa se alguma espécie desse gênero, na América Tropical, tivesse 18 cromossomos somáticos, mas isso não foi verificado. Um quarto de século depois dessa suposição de Perry, CRUZ (1968) descartou totalmente a possibilidade de poliploidia no gênero, após analisar citologicamente diversas espécies e variedades de *Manihot* pertencentes a 3 seções distintas. Segundo a autora, não foram encontradas células poliplóides e nem anomalias cromossômicas que pudessem produzir plantas com números diferentes de cromossomos através da propagação vegetativa no gênero.

GRANER (1941), após relatar em *M. esculenta* a ocorrência de 36 cromossomos em pontas de raiz de 37 variedades cultivadas em diferentes regiões do Brasil, e 18 bivalentes na microsporogênese das mesmas variedades, tratou algumas dessas plantas com colchicina e, em tais plantas tratadas, a média do tamanho dos estômatos foi de $40\mu\text{m}$, ao passo que nas plantas controle, tal média foi de $28\mu\text{m}$. GRANER (1942b) verificou que esse aumento no tamanho dos estômatos teve correlação com o aumento do número de cromossomos no 'Vassourinha Paulista'. Tanto as flores femininas quanto as masculinas e também as anteras e grãos de pólen, sofreram aumento considerável nas plantas tratadas com colchicina (GRANER, 1941; 1942b). Tais observações de Graner acrescentam um exemplo a mais nos citados por STEBBINS (1971) de que um dos eventos mais comuns na poliploidização é o tamanho aumentado dos estômatos; outro fato comumente encontrado é o efeito da gigantização em órgãos que têm um padrão de crescimento determinado, como flores e sementes.

Um dos aspectos morfológicos que GRANER (1942b) verificou para a identificação das plantas, foi a ocorrência de lobos mais largos nas extremidades das folhas. STEBBINS (1971) assinalou exemplos em *Datura* e em *Solanum* da ocorrência de lobos mais largos e menores. Por fim, GRANER (1944) verificou que no 'Vassourinha Paulista' com $2n = 4x = 72$ houve um crescimento mais lento no primeiro ciclo vegetativo, se comparado com as plantas diplóides, e a planta octoplóide ($2n = 8x = 144$), permaneceu anã. Segundo STEBBINS (1940), os níveis mais altos de ploidia não mostram qualquer aumento em tamanho e podem mesmo ser anões, enquanto muitos poliplóides de níveis mais baixos

de ploidia podem ter um desenvolvimento mais lento. As plantas tratadas com colchicina por Graner, não foram bem sucedidas em termos de desenvolvimento.

MAGOON et al. (1968) considera a mandioca cultivada como sendo um alopoliplóide, porque sugere que ela tenha se originado do cruzamento entre duas formas relacionadas (diplóides) com seis tipos cromossômicos iguais e diferindo em três tipos (alopoliplóides). Esses autores citam que as plantas diplóides geralmente têm 1 ou 2 cromossomos nucleolares. A mandioca, por sua vez, possui 3 destes cromossomos, podendo então, sugerir a origem poliplóide de *M. esculenta*. A não existência do quarto cromossomo nucleolar pode ser suspeitada como devida à supressão do seu organizador nucleolar.

UMANAH & HARTMANN (1973) trabalharam com 10 cultivares de *Manihot esculenta* e com *M. glaziovii* e verificaram que as duas espécies são tetraplóides com cariótipos similares, principalmente no tocante à média do comprimento dos braços, posição do centrômero e número de satélites. O cariótipo da mandioca, segundo esses autores, é assimétrico, sendo identificado por eles, 13 tipos cromossômicos.

ARMECIN & CARPENA (1982), analisando células meióticas de mandioca, verificaram a formação, em algumas células, de univalentes e trivalentes, consequência da homologia parcial de certos cromossomos, considerando a possibilidade de um alotetraplóide segmental.

PERRY (1943), verificando a ocorrência de uma série cromossômica de $x = 8$ nos gêneros e espécies primitivos de Euphorbiaceae, assinala que talvez esse seja o número básico primário para a família. Porém, o acúmulo de dados parece indicar que essa suposição de PERRY (1943) seja pouco provável, e que a referida família seja polifilética em origem, tendo, no mínimo, dois números cromossômicos básicos: $x = 7$ e $x = 13$. Isso tem o respaldo de estudos de citogeografia que revelaram que a família tem esses dois números encontrados nos gêneros da Ásia e da América, regiões prováveis da origem das Euphorbiaceae. Esses continentes, inclusive, apresentam o maior número de taxa poliplóides (HANS, 1973).

Os dois números cromossômicos básicos poderiam ter tido origem independente e a explicação sugerida é que $x = 7$, seguido de aneuploidia, ou pela aneuploidia anfidiplóidia de taxa com $x = 7$ e $x = 6$ (HANS, 1973).

Os números cromossômicos de diversos gêneros de *Euphorbiaceae* distantemente relacionados, indicaram a presença de várias séries cromossômicas, sendo que a ocorrência mais comum foi de $x = 7 - 8 - 9$, e a série $x = 6 - 10 - 11$ foi secundária em importância (PERRY, 1943). A estas séries, HANS (1973) acrescenta ainda séries de $x = 12 - 15 - 16 - 17 - 18$, o que concorda com a complexidade morfológica e taxonômica da família. RAVEN (1975), cita que na subfamília *Euphorbiaceae* (*Crotonoideae*), a que abriga o gênero *Manihot*, os números básicos mais frequentes são $x = 9 - 10 - 11$; desses, $x = 11$ é o mais provável de ser o número básico original.

A poliploidia e a aneuploidia foram eventos efetivos na especiação desta família (PERRY, 1943), tanto que, nas espécies de angiospermas a poliploidia ocorre em uma frequência de aproximadamente 30-35% (GRANT, 1971; STEBBINS, 1971), nas *Euphorbiaceae* esse fenômeno tem uma incidência de cerca de 50% (PERRY, 1943; HANS, 1973).

Embora não possa ser tomado como uma regra que o número elevado de cromossomos seja sinônimo de poliploidia (GRANT, 1971; STEBBINS, 1971), de um modo geral, os gêneros ou famílias com números básicos de $x = 12$ ou superiores a esse, são poliplóides derivados de grupos com números mais baixos. Os gêneros complexos e de ampla ocorrência sofrem um importante efeito da poliploidia no seu desenvolvimento (STEBBINS, 1940). Ainda, as mais baixas frequências de poliploidia são encontradas em regiões de clima temperado e subtropical, sendo que em áreas de clima mais frio, ou quente, esta porcentagem aumenta (STEBBINS, 1966, 1971).

O hábito das plantas e o modo de reprodução são fatores que influem sobremaneira no estabelecimento da poliploidia. Desse modo, as plantas que combinam o hábito perene com a reprodução assexuada, principalmente por rizomas e estolões, apresentam a maior incidência de poliploidia (STEBBINS, 1971).

CRUZ (1968) assinala que com o uso de técnicas convencionais em citologia, os cromossomos em *Manihot* apresentam-se pequenos e semelhantes entre si, não sendo possível analogias morfológicas. CHODA & MEHRA (1972) citam que o tamanho dos cromossomos em Euphorbiaceae diminui com o aumento do grau de ploidia.

Pelos trabalhos de MAGOON et al. (1968) e UMANAH & HARTMANN (1973), pode-se verificar que o cariótipo em mandioca é assimétrico e, conforme citado por STEBBINS (1971), a assimetria cariotípica é uma característica considerada evoluída. A partir desses trabalhos, podem ser desenvolvidos estudos para elucidação dos ancestrais de *M. esculenta*, além de auxiliar na taxonomia do gênero *Manihot*.

É interessante lembrar que, excetuando-se o estudo de meiose, que revela 18 bivalentes, os demais trabalhos de citologia foram realizados com poucas espécies e poucas variedades de *Manihot*, portanto, uma generalização seria demasiado arriscada. Principalmente, quando se sabe que a domesticação da mandioca pode ter ocorrido em vários locais.

2.1.3. Origem, Geografia e Ecologia

As culturas de raízes e tubérculos se originaram em regiões tropicais e há três regiões em que elas foram independentemente domesticadas (LÉON, 1977): (1) Sudeste da Ásia; (2) África - Madagáscar; (3) América Tropical. Esta última, em particular, tem maior interesse para nós por ser a área onde ocorreu a domesticação da mandioca. Um dos poucos autores que discordou dessa origem americana da mandioca foi RAYNAL (1772) apud RENVOIZE (1972), ao citar que a sua introdução foi feita da África para a América, mas as evidências de Raynal foram poucas e a origem americana da mandioca se tornou efetivamente demonstrada por autores subseqüentes (RENVOLIZE, 1972; LÉON, 1977). MAUNY (1953) apud HEISER (1973) citou que foram os portugueses que introduziram a mandioca na África, durante o século XVI. Na Índia e Sudeste da Ásia ela foi introduzida no final do século XIX (HEISER, 1973; LÉON, 1977).

O principal ponto de discussão gira em torno de qual região dos trópicos americanos a mandioca é proveniente, pois há desconhecimento sobre a época e o local precisos de sua domesticação. A espécie *M. esculenta* é tida como um cultígeno, isto é, foi conhecida sempre no estado de cultivo (RENVOIZE, 1972; HEISER, 1973; ROGERS & APPAN, 1973; JENNINGS, 1976; LÉON, 1977).

Uma das primeiras proposições sobre o centro de origem da mandioca foi feita por DE CANDOLLE (1882) apud RENVOIZE (1972), sugerindo um centro Brasileiro-Paraguaio. De Candolle baseou a sua hipótese no fato de haver abundância de espécies selvagens nessa região e, também, devido à antiguidade do cultivo da mandioca e à diversidade de espécies do gênero no nordeste brasileiro. Essa sugestão de De Candolle foi sustentada por muito tempo, principalmente com o advento da teoria de Vavilov, propondo que a área de origem de uma planta cultivada é indicada pela máxima diversidade varietal das espécies (RENVOIZE, 1972; NASSAR, 1978a). Mas HARLAN (1951) mostrou que o centro de diversidade para uma dada cultura pode ocorrer distante do seu centro de origem e, quanto à expressão "centro", HARLAN (1971) apontou que uma cultura não se origina necessariamente em uma área delimitada e dela se dispersa ("centro"); ela pode se originar sobre uma vasta área, sem um local preciso ("não centro"). Tanto os "centro" quanto os "não centro", *sensu* HARLAN (1971), podem ter pequenos locais de grande diversidade de determinada espécie. Esses pontos de diversidade, HARLAN (1951) os definiu como microcentros. NASSAR (1978a) cita que esses microcentros servem para caracterizar a situação do gênero *Manihot*: apesar do Brasil Central ser uma das principais áreas de diversidade do gênero, pois, das 98 espécies reconhecidas por ROGERS & APPAN (1973), 26 ocorrem nessa área, poucas espécies são encontradas em grandes extensões no Estado de Goiás; mas, em duas regiões desse Estado, de 100 km de diâmetro cada uma, delimitadas por NASSAR (1978a) - Goiás Velho e Corumbá de Goiás - há agregados de até 20 espécies de *Manihot*.

Com os novos conceitos de HARLAN (1951), com base em considerações ecológicas e com a comprovação arqueológica de que a farinha de mandioca foi importante nos 2º e 3º milênios a.C., no Nordeste da América do Sul e, com a descoberta

de cerâmicas, semelhantes às usadas em épocas mais recentes para cozer bolo de mandioca, SAUER (1952) apud RENVOIZE (1972) , apresentou essa região como sendo a área de origem da mandioca, mais precisamente as savanas da Venezuela (WILLEY, 1960; RENVOIZE, 1972; JENNINGS, 1976).

Baseando-se em achados arqueológicos , RENVOIZE (1972) propôs um outro centro de origem para *M. esculenta* na América Central.

ROGERS (1965) pondera que os três centros de origem citados para a espécie são hipóteses que têm algum mérito. HEISER (1973) cita que pode ter havido domesticação independente da mandioca nas Américas do Sul e Central, mas parece mais provável que tenha sido levada da América do Sul para a América Central.

Em se aceitando a domesticação da mandioca na América do Sul, pode-se pensar na sugestão do centro Brasileiro-Paraguaio como plausível para explicar a origem dessa cultura e retornar à idéia de De Candolle de que ela provém do Nordeste Brasileiro. Não pela explicação de Vavilov e nem por dados arqueológicos, pois, como citou RENVOIZE (1972), o registro arqueológico é incipiente no Nordeste do Brasil, mas podemos atentar para estudos de fisiologia e ecologia para justificar a favor da origem nordestina da mandioca, conforme sugere VIÉGAS (1976). Esse autor cita que as pesquisas no campo da fisiologia indicam que a mandioca é uma planta de terreno aberto, quente, seco, com alto índice de insolação. Com um mínimo de intensidade luminosa ela cresce com vigor, sem se ramificar, e as altas temperaturas nos meses mais quentes do ano não prejudicam o seu desenvolvimento vegetativo, o que justifica uma primeira conclusão de que o centro de origem da espécie deve estar em uma faixa entre 20° e 25° de latitude; além disso, as espécies selvagens próprias das áreas secas do Sertão Brasileiro são muitas, ao contrário do que ocorre na Floresta Amazônica, que é pobre em espécies autóctones. Se VIÉGAS (1976), a atribuir a origem da mandioca ao Nordeste do Brasil elimina a possibilidade de ser originária do Amazonas, NASSAR (1978 b) prefere dar crédito à hipótese de SCHMIDT (1951) de que os Arauak eram povos agricultores e viviam no norte do Amazonas ,

cultivando a mandioca há muitos séculos antes da era Colombiana. Essa tribo, por alguma razão, foi obrigada a migrar para a América Central e dentre as diversas explicações levantadas para esse episódio, uma delas foi a de que os Arauak estavam à procura de solo melhor para o cultivo dessa Euphorbiaceae. Isso não nos parece muito plausível, uma vez que a mandioca não é exigente em termos de solo, adaptando-se a condições adversas e ocorrendo em solos arenosos.

A despeito desta ou daquela área de origem, pode-se dizer com precisão que o gênero só ocorre entre o sudoeste dos Estados Unidos (33°N) e a Argentina (33°S). JENNINGS (1976) ROGERS (1963), ao examinarem o centro de especiação do gênero, mostraram que há duas grandes concentrações de espécies: uma na região coincidindo com o centro Brasileiro-Paraguaio, que compreende uma latitude entre 5° e 20°, e um outro, ao nordeste da costa do México, cobrindo parte da Guatemala, El Salvador e Nicarágua, entre 15° e 30° de latitude. NASSAR (1978b) apresenta quatro centros de diversidade para *Manihot*, sendo que o do México, Planalto Boliviano e Brasil Central podem ser explicados, segundo esse autor, pela rota de migração dos Arauak. O outro centro de diversidade, conforme o autor em questão, é no Nordeste Brasileiro. A existência desse centro o autor prefere explicar como sendo resultado da migração dos Tupi-Guarani.

Apesar de todas as espécies do gênero serem nativas dos trópicos do Novo Mundo, das 98 espécies admitidas por ROGERS & APPAN (1973), 80 são da América do Sul, principalmente dos Estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia. A sua presença em outras regiões já é uma constante devido às sucessivas introduções. Assim, *M. grahami* Hooker, nativa do Sudeste do Brasil e Nordeste da Argentina, está sendo atualmente encontrada nos Estados Unidos, do Oeste da Flórida para a Louisiana, devido a introduções passadas; *M. glaziovii* Müll. Arg., nativa do Nordeste do Brasil, tem sido encontrada, como resultado de introduções, em algumas regiões da Malaya, Índia e África (ROGERS & APPAN, 1973). As introduções de muitos cultivares ocorreram com a migração de populações nativas, que levavam consigo ramos de cultivares de sua área original (ROGERS, 1965). A

ocorrência de tantos cultivares para *M. esculenta* é resultado de uma seleção disruptiva (JENNINGS, 1976) e atualmente há um número tão grande de cultivares que equívocos têm sido cometidos, não raro se deparando com cultivares diferentes tendo o mesmo nome, ou cultivares iguais possuindo nomes diferentes (LORENZI & MONTEIRO, 1980). Em termos de domesticação, a seleção foi para maior tuberização e para a capacidade de estabelecimento fácil a partir de manivas (JENNINGS, 1976).

STEWART (1948) apud ROGERS (1963) assinalou que existe uma distinção no padrão de distribuição geográfica entre as categorias doce e amarga. Por esse registro, a mandioca doce tem uma distribuição mais ampla do que a amarga. Embora as variedades de mandioca doce não exijam um clima tão quente como as outras, e também sejam mais resistentes à seca, tal diferença no padrão de distribuição não pode ser atribuída ao clima somente. SAUER (1950) apud ROGERS (1963) sugeriu que em muitas regiões pode ter havido uma perda de receptividade das formas amargas, ou que estas formas poderiam ter sido suplantadas por outras culturas. Assim, na Colômbia e América Central, conforme foi colocado por STEWARD (1948) apud ROGERS (1963), não há registros da ocorrência da mandioca amarga. Os registros arqueológicos indicam que a distribuição da mandioca amarga, no passado, foi diferente do padrão encontrado nos dias atuais (ROGERS, 1965; RENVOIZE, 1972). Segundo RENVOIZE (1972), nas regiões em que só ocorre mandioca doce, ela nunca obteve um papel preponderante no complexo das culturas locais e está associada com aquelas áreas em que o milho tem predomínio.

SCHMIDT (1951), citando PERICOT & GARCIA (s/data), relata que NORDENSKIÖLD (1924) cartografou a distribuição do cultivo da mandioca na América do Sul e, segundo SCHMIDT (loc. cit.), se for traçada uma linha reta entre África, Chile e Rio Grande do Sul, haverá ocorrência de mandioca doce em todo o norte dessa linha, sendo que há um cinturão periférico só de mandioca amarga em todo o limite sul e ocidental desse traçado. SEMLER (1914) apud CONCEIÇÃO (1981) estudou a distribuição da mandioca doce no Brasil e encontrou-a desde as margens do Rio Paranã até o Planalto Central, seco, com noites frias, enquanto a forma amarga tem uma distribuição pela faixa litorânea do Atlântico, de baixa altitude e de temperaturas mais elevadas,

e também ao longo do Rio Amazonas e seus afluentes.

Se, de um lado, é nítida a discrepância na distribuição geográfica das duas mandiocas, a origem das variedades doces é uma questão difícil de se solucionar. ROGERS (1965) prefere atribuir ao acaso a transformação das plantas com alto teor de glicosídeos cianogênicos a produtos comestíveis: essa transformação exige tecnologia avançada e os nativos não tinham desenvolvimento cultural para tanto.

Embora haja evidências da importância, no passado remoto, tais evidências são fracas para se decidir se as mandiocas nos dias atuais são descendentes de uma simples espécie ou de várias. JENNINGS (1976); ROGERS & APPAN (1973) indicam que as espécies *M. aesculifolia* McVaugh, *M. rubricaulis* I. M. Johnston e *M. pringlei* Watson são os parentes mais próximos de *M. esculenta*. Cada uma dessas espécies possui um hábito de crescimento mais ou menos ereto e raízes tuberosas rudimentares; *M. pringlei* tem uma característica incomum entre as espécies selvagens: baixo teor de ácidos cianogênicos. NASSAR (1978c) coloca em dúvida se *M. aesculifolia* e *M. pringlei* contribuíram com genes para a origem de *M. esculenta*, ou se as características que elas possuem são originárias da hibridação entre *M. esculenta* e alguma espécie nativa do México. ROGERS (1962) assinala que um número de espécies nativas pode ter sido derivado da espécie cultivada. Este grupo de espécies invariavelmente ocorre em áreas perturbadas e são extremamente polimórficas. VIÉGAS (1976) enfatiza que *M. esculenta* é descendente de *M. pusilla* Pohl, que é originária do Estado de Goiás.

NASSAR (1978b) considera que o Brasil Central é o centro primário de diversidade das espécies, pela idade antiga da área e por existirem nessa região as espécies com características mais antigas: *M. stipularis* Pax & K. Hoffmann, *M. pusilla* Pohl, *M. longepetiolata* Pohl, com inflorescências dióicas, e *M. stricta* Baillon, *M. purpureo-costata* Pohl e *M. salicifolia* Pohl, com folhas sésseis não lobadas.

As espécies têm um hábito heliófilo e têm características de invasoras habitando áreas perturbadas, porém, nunca se tornam membros dominantes da vegetação local (ROGERS &

APPAN, 1973). A mandioca cresce principalmente em solos pobres dos trópicos, onde a precipitação pluviométrica é superior a 750 mm/ano, mas ela também consegue sobreviver em regiões com índices inferiores a esse, ou mesmo com períodos de seca de 5 a 6 meses (COCK, 1984). Apesar de a temperatura ótima estar em torno de 24°C a 25°C, ela resiste até 35°C. Temperaturas inferiores a 10°C prejudicam a planta (CONCEIÇÃO, 1981). Embora pouco se conheça sobre o florescimento em mandioca, parece que o seu florescimento é melhor em temperaturas de aproximadamente 24°C e, em alguns cultivares, conforme citação de KEATING (1981) apud COCK (1984), parece que a ramificação é promovida em dias longos. A altitude ideal para o crescimento da mandioca é entre 600-800 m, de um modo geral não sendo encontrada em altitudes superiores a 2000m, devido à sua susceptibilidade ao frio. Em regiões próximas ao Equador, contudo, elas podem ocorrer em altitudes superiores a 2300m (ROGERS & APPAN, 1973; CONCEIÇÃO, 1981; COCK, 1984). O crescimento da mandioca com temperaturas variáveis é muito diferente do crescimento em ambientes com temperatura constante. IKURA et al. (1979) apud COCK (1984) verificaram que altas temperaturas e fotoperíodo longo diminuem a proporção de matéria seca, passando para as raízes.

2.2. Sistemas Reprodutivos

2.2.1. Introdução

Devido à grande quantidade de estudos referentes à reprodução nas plantas, seria impossível sermos completos nessa nossa revisão e, também, não pretendemos apresentar um estudo de casos, nem fazer uma retrospectiva histórica, mas sim, reunir os autores mais expressivos e os trabalhos que tenham uma maior significação no que tange aos aspectos ecológicos e evolucionários desses sistemas. Procuraremos, também, abordar as principais análises que devem ser realizadas para aproximar o máximo possível do conhecimento da maneira como realmente uma determinada espécie de planta se reproduz, Sempre que possível, consideraremos a reprodução na família Euphorbiaceae, e

faremos menção às regiões tropicais, mas estamos cientes que os padrões nos trópicos são muito distintos daqueles que ocorrem nas regiões temperadas e poucos estudos foram feitos a respeito. Portanto, uma generalização não é recomendada.

2.2.2. Importância

A importância da reprodução nas plantas vem desde o período da civilização em que o homem era coletor, período em que o homem já estava c^oscio de que as flores são os precursores dos frutos e sementes. É atribuído aos gregos e aos assírios primitivos o reconhecimento de que o órgão sexual das plantas é a flor. Foi, também, desde o início da civilização agrícola, reconhecida a importância do pólen para a formação de frutos e, por volta de 2000 a.C., já havia registro de polinização artificial em plantas dióicas, segundo ROBERTS (1929) citado por FRANKEL & GALUN (1977).

As principais aplicações do conhecimento do modo de polinização são as seguintes:

- (a) Sistemática, fitogeografia e outros ramos da botânica (FRYXELL, 1957). Conforme BULLOCK (1985), é fundamental o conhecimento da composição taxonômica da flora, pois é bastante evidente a associação entre os sistemas sexuais e os grupos sistemáticos;
- (b) Aspectos ligados à comunidade: conhecimento das tendências sucessionais em terras de fazendas abandonadas e na manipulação de terras aradas ainda não plantadas (BULLOCK, 1985);
- (c) Programas de arborizações: esta seria uma das aplicações imediatas do levantamento dos sistemas reprodutivos (COPE, 1962; STYLES, 1972; HEDEGART, 1976; BOLSTAD & BAWA, 1982) apud BULLOCK (1985). Em termos de período de florescimento, seria importante, para se ter em parques e jardins plantas florescendo o ano todo. Outro ponto importante, seria conhecer os polinizadores

das espécies plantadas, tanto para se ter diversidade da fauna nos parques e jardins, como para não se plantar espécies que fossem polinizadas por insetos ou pássaros nocivos ao homem, ou que não conseguem conviver em áreas urbanas. Um outro aspecto, seria no tocante à manutenção para produção de mudas para eventuais reposições;

- (d) Diversidade genética: o conhecimento, a exploração e a conservação da diversidade genética que ocorre nos diferentes indivíduos e nas diversas famílias, são de extrema importância (HAMRICK et al., 1979; BULLOCK, 1985). E esta questão é complexa no tocante às angiospermas, porque, se de um lado, a grande variabilidade existente nas gimnospermas pode, por estudos de variação de aloenzimas, ser atribuída ao fato de essa divisão compreender árvores de grande longevidade, serem primariamente alógamas e terem alta taxa de fecundidade, as diferenças entre monocotiledôneas e dicotiledôneas são mais difíceis de serem explicadas, uma vez que ambos os grupos contêm espécies possuindo grande diversidade de sistemas de cruzamento, graus diferentes de longevidade e de fecundidade (HAMRICK et al., 1979);
- (e) Evolução: tais estudos são de grande valia como fonte de informação para compreender a história evolutiva de determinado grupo de plantas, a especiação e as relações entre as espécies (FRYXELL, 1975; BAWA, 1974).

2.2.3. Tipos Principais

Segundo STEBBINS (1950), a principal força que direciona a evolução é a recombinação, e existem duas classes de fatores que influenciam tanto a taxa quanto a natureza da recombinação. Os fatores externos atuam sobre a recombinação a partir da sua influência no tamanho e estrutura das populações. Os fatores internos, conforme DARLINGTON (1939) e HUXLEY (1942) apud STEBBINS (1950), são coletivamente denominados siste-

ma genético, que compreende tanto o aparato cromossômico como o tipo de reprodução. GRANT (1975) assinala que o sistema genético é o sistema de variação hereditária que reúne os fatores que determinam um equilíbrio entre a conservação do genótipo e a variabilidade genotípica.

CARSON (1975) apud (GRANT, 1975), reconheceu três modos de variação contínua no sistema de recombinação: fechado (sistema mantido por apomixia obrigatória), restrito (sistema mantido por autogamia) e aberto (sistema mantido por alogamia).

Entre as plantas, há diversos tipos de sistemas genéticos (STEBBINS, 1950; GRANT, 1975), nos quais elementos como sexualidade, diploidia, fertilização cruzada, recombinação e grupos de ligação, se desenvolvem em vários graus. Esses tipos de sistemas genéticos não se distribuem ao acaso: eles são adaptativos (STEBBINS, 1950; GRANT, 1975) e são correlacionados com várias características, como forma de vida das plantas, morfologia e tipo de habitat (STEBBINS, 1950). Em cada espécie de *Lycopersicon*, por exemplo, os sistemas de cruzamento têm evoluído como variação adaptativa na aparência e estrutura floral e conseqüente regulação da estrutura genética das populações naturais. Na espécie *L. pimpinellifolium* (autocompatível) as taxas de polinização cruzada variam de 0% a 84% e são altamente correlacionadas com os traços florais (RICK et al, 1978).

2.2.4. Evolução e Ocorrência dos Sistemas Reprodutivos

Em termos amplos, os sistemas reprodutivos podem ser reunidos da seguinte maneira: reprodução sexuada (alogamia e autogamia) e reprodução assexuada (propagação vegetativa e agamospermia) (JAIN, 1976; KEVAN, 1983). A nosso ver, embora extremamente oportuna e válida essa separação dos sistemas reprodutivos, gostaríamos de enfatizar que esses sistemas, e muitas espécies, não são absolutos e, melhor do que dizer que determinada espécie possui este ou aquele sistema de reprodução ou combinação destes, seria dizer que tal espécie tem uma maior tendência a um determinado sistema.

De acordo com KEVAN (1983), há uma variedade de caminhos pelos quais as plantas se reproduzem. Para determinada espécie, um mecanismo tende a predominar, mas uma mistura de estratégias é usada por muitas plantas. Para um dado grupo de plantas, os métodos reprodutivos variam de lugar para lugar e de tempo em tempo. Essa variação espacial e temporal nos métodos de cruzamento é condicionada tanto por fatores genéticos, como por fatores do ambiente (FRYXELL, 1957). Alguns exemplos dessa interferência genética e ambiental podem ser citados: NYGREN (1951) observou raças de *Calamagrostis purpurea* (Trin.) Trin. e verificou que elas apresentavam certa versatilidade no comportamento reprodutivo, a qual era condicionada por fatores genéticos. Nessa espécie, as panículas no início do florescimento reproduziam-se por métodos sexuais normais, enquanto as últimas se reproduziam apomiticamente.

Em *Dichanthium* Willem. e em *Taraxacum* L., a forma de reprodução predominante, ora sexual, ora apomítica, varia conforme a distribuição geográfica das espécies desses gêneros (STEBBINS, 1941).

Apesar dos dados filogenéticos sobre os mecanismos de cruzamento serem incipientes, em alguns casos é possível de terminar qual sistema é mais recente em origem e qual é mais antigo e primário. De acordo com o entendimento de muitos autores, os diversos sistemas não são relacionados e se originaram independentemente e em ocasiões separadas (BATEMAN, 1952; CROWE, 1964).

2.2.4.1. Reprodução Sexuada

(a) ALOGAMIA

A polinização cruzada é obrigatoriamente adquirida com o dioicismo, heterostilia a hermafroditismo, e monoicismo (estes três últimos, com a combinação da auto-incompatibilidade). De maneira menos rígida, a alogamia também pode ser promovida por monoicismo, ginomonoicismo, auto-incompatibilidade incompleta e hermafroditismo com protandria ou protoginia. A taxa máxima deste sistema é promovida com o dioicismo ou com au-

to incompatibilidade completa (GRANT, 1975).

Dos sistemas que favorecem a alogamia, o mais comum é a incompatibilidade (LEWIS, 1979), com uma alta frequência e uma ampla distribuição nas angiospermas, ocorrendo em todas as linhas filogenéticas (BATEMAN, 1952; FRYXELL, 1957; CROWE, 1964; ARASU, 1968). O tipo primitivo e mais abundante de incompatibilidade é a gametofítica (ARASU, 1968).

A incompatibilidade pode ocorrer tanto em espécies hermafroditas, como nas espécies monóicas, com flores unissexuais na mesma planta (GODLEY, 1955).

A dioícia é outro modo de reprodução que torna obrigatória a polinização cruzada e, conforme LEWIS (1942) apud CROWE (1964) concluiu, por estudos taxonômicos, ela se originou tanto de ancestrais hermafroditas (heterostílicos), como de flores de sexos separados. A origem da dioícia a partir de ancestrais monóicos é o caso mais encontrado, pelo fato da monoícia ser mais comum que a heterostilia.

Em todas as famílias de angiospermas, os registros sugerem uma ocorrência de dioícia de cerca de 75%, com maior incidência em plantas lenhosas que herbáceas e, também, com maior incidência em árvores de florestas tropicais do que temperadas (CROWE, 1964; BAWA & OPLER, 1975). Apesar dessa incidência de 75%, a dioícia é considerada rara, no sentido de ocorrer espalhada na sua distribuição sistemática, sem se concentrar em determinadas famílias (GRANT, 1975).

Como foi mencionado, a dioícia e a incompatibilidade promovem a alogamia de uma forma rígida. Mas a fecundação cruzada pode também ser buscada por mecanismos menos absolutos, como o monoicismo e a dicogamia (GRANT, 1975).

O monoicismo é uma condição derivada nas angiospermas e largamente distribuído. Ele só se torna um mecanismo que força obrigatoriamente a polinização cruzada, quando combinado com a auto-incompatibilidade (GRANT, 1975). Muitas plantas monóicas passam por fases distintas no florescimento, ou seja, um período com abertura de flores masculinas e um período com

abertura de flores femininas (BAWA, 1983). Neste caso, teríamos uma planta monóica apresentando dicogamia (FRANKEL & GALUN, 1977).

A dicogamia, contudo, pode ocorrer não na planta, como um todo, mas nas flores, isoladamente, sendo então, o caso de ocorrer em flores hermafroditas (FRANKEL & GALUN, 1977).

Em *Lobelia cardinalis*, espécie cujas inflorescências têm as flores estaminadas no topo e são autocompatíveis, a autofecundação é minimizada através da protandria, na qual a fase estaminada é mais longa e produz mais néctar que a fase pistilada, isso fazendo com que a fase estaminada das flores seja freqüentada com mais intensidade pelo agente polinizador, o que promove a fecundação cruzada (DEVLIN & STEPHSON, 1985).

(b) AUTOGAMIA

Quando se pensa na reprodução sexuada, um ponto de aceitação comum é que a autogamia é uma condição derivada da alogamia e, provavelmente, originou-se das plantas cuja polinização era feita por abelhas e borboletas (STEBBINS, 1950; FRYXELL, 1957; GRANT, 1971, 1975; JAIN, 1976).

A taxa de autopolinização varia em diferentes graus quando a polinização é entre indivíduos de um mesmo clone, ou quando há geitonogamia, até uma taxa de 100%, no caso de cleistogamia (JAIN, 1976; FRANKEL & GALUN, 1977).

A autopolinização tem uma distribuição grande nas angiospermas, com um predomínio em plantas herbáceas e anuais. Uma das famílias mais típicas, cujo predomínio de reprodução é por autogamia, é a família Polemoniaceae (GRANT, 1971, 1975; JAIN, 1976)

2.2.4.2. Reprodução Assexuada

(a) PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

Este meio de reprodução é amplamente distribuído entre as angiospermas perenes (GRANT, 1971). Conforme GUSTAFSSON (1946, 1947) apud STEBBINS (1941), 80% das espécies de angiospermas em certas floras da Escandinávia possuem algum tipo de reprodução vegetativa.

(b) AGAMOSPERMIA

A produção de sementes agamospêrmicas pode ser obtida sem que haja polinização, ou pode requerer a polinização, porém, não a fecundação (pseudogamia). Este tipo de reprodução pode ocorrer em graus variáveis, quando combinada com a reprodução sexuada e, no caso, fala-se em agamospermia facultativa ou pode ser absoluta; fala-se, então, em apomixia obrigatória (GRANT, 1971; FRANKEL & GALUN, 1977; BRIGGS & WALTERS, 1984) .

Esse sistema de reprodução tem uma grande distribuição nas angiospermas, principalmente em Gramineae e Rosaceae. Os indivíduos de reprodução sexuada, aparentados daqueles que se reproduzem por agamospermia, são, de modo geral, de fertilização cruzada, produzida por meio de auto-incompatibilidade ou dioicismo, embora outros meios de reprodução sexuada nos ancestrais agamospêrmicos ocorram (GRANT, 1971).

Para finalizar esta breve consideração sobre os sistemas de reprodução, em termos de filogenia e ocorrência, poderíamos fazer uma síntese, citando GRANT (1975), que menciona que a autogamia, agamospermia e propagação vegetativa obrigatória são condições derivadas, assim como, o dioicismo e o monoicismo. A vasta distribuição sistemática, indica que a importante mudança evolucionária do hermafroditismo para os sistemas de polinização cruzada, tem ocorrido várias vezes. Há evidências que sugerem que a auto-incompatibilidade nas angiospermas hermafroditas é uma condição filogenética derivada.

2.2.5. Sistemas de Reprodução na Vegetação Tropical

Após a leitura de alguns trabalhos sobre os sistemas reprodutivos em florestas tropicais, podemos tomar como chancela o trabalho de BAWA (1974), que por seu cunho experimental, alterou as idéias correntes sobre a incidência dos sistemas reprodutivos em tais florestas. Essas idéias, até então disseminadas com base exclusivamente em suposições teóricas, foram por muito tempo aceitas sem contestação. Assim, CORNER (1954) apud BAWA (1974), sugeriu que a mobilidade dos polinizadores a pequenas distâncias seria um fator suficiente para assegurar às espécies desse habitat, um predomínio de autopolinização. Depois dessa explicação de Corner, outras vieram para justificar a autocompatibilidade nas espécies de florestas tropicais. Para STEBBINS (1957), nessas regiões há obstáculos aéreos que impedem um movimento eficiente do pólen no ar; então, as plantas seriam predominantemente autógamas.

BAKER (1959) apud BAWA (1974), disse que a estrutura altamente complexa dessas florestas era a responsável pela autopolinização. FEDEROV (1966) apud BAWA (1974) atribuiu esse tipo de reprodução, não apenas ao assincronismo do florescimento, mas, também, ao isolamento espacial dos indivíduos da mesma espécie e à baixa densidade de populações das árvores de florestas úmidas. Todas essas idéias começaram a perder o respaldo no final da década de 1960, quando ASHTON (1969) contrariou o pensamento inicial de Corner, lançando a hipótese de que as árvores de florestas tropicais úmidas são predominantemente de polinização cruzada. JANZEN (1971) demonstrou que as abelhas do gênero *Euglossine* podem realizar vôos a longas distâncias para transporte de pólen de plantas tropicais amplamente dispersas. BAWA (1974) trabalhou em uma mata em Guanacaste com 130 espécies e tentou quantificar a taxa real de tipos de cruzamentos nas árvores das florestas tropicais dessa região, e verificou que o predomínio é realmente de polinização cruzada, uma vez que 54% das espécies estudadas se mostraram autoincompatíveis e, 14%, autocompatíveis, tendo ainda encontrado 22% de espécies dióicas e 10% de espécies monóicas, muitas das

quais autocompatíveis. Apesar de somente com BAWA (1974) ter sido experimentalmente comprovada a predominância da alogamia em árvores de florestas tropicais, FRYXELL (1957) já havia postulado que a grande maioria, ou todas as espécies dessas árvores, são alógamas.

Todavia, o estudo de BAWA (1974), como considera BULLOCK (1985), foi desenvolvido em um tempo em que a flora de Guanacaste (Costa Rica), região onde BAWA (1974) conduziu os seus experimentos, não estava totalmente conhecida, além do referido autor ter trabalhado apenas com espécies arbóreas. O relato de BAWA (1974) foi limitado a descrever o tipo de reprodução para cada uma das 130 espécies da região.

Do trabalho de BAWA (1974) para os dias de hoje, podemos notar uma dinamização no estudo dos sistemas reprodutivos, procurando associar o maior número possível de características com o estabelecimento de um ou de outro sistema. Dessa forma, nos deparamos atualmente com trabalhos como os de FOX (1985) que, ao estudar a evolução da dioiccia, julgou por bem não analisar a sua incidência isolada nos taxa, mas sim, correlacioná-la com a forma de crescimento, método de dispersão e síndrome de polinização. A compreensão da dispersão do pólen e das sementes, bem como dos agentes dessa dispersão, é fundamental, pois o fluxo gênico entre as populações depende desta dispersão (GRANT, 1980).

O sistema de cruzamento das espécies e o mecanismo de dispersão de sementes, afeta diretamente a distribuição da variação genética dentro e entre populações. Estudos de níveis de variação de aloenzimas em diferentes espécies, indicam que os indivíduos pertencentes a espécies polinizadas por animais, que são alógamas, ou que combinam mais de um sistema de cruzamento, têm níveis mais altos de variação. As espécies com pequeno tamanho de população, reprodução vegetativa e dispersão limitada de pólen e semente, possuem pouca variação dentro da população e uma variação maior entre populações (HAMRICK, 1983).

BULLOCK (1985) menciona a importância da análise de toda a gama dos sistemas de reprodução em diferentes tipos

de habitat, levando em conta a topografia, o tipo e a profundidade do solo, os sistemas de drenagens e o conteúdo orgânico.

A plena compreensão da fenologia é relevante, quando se trata da reprodução. BAWA (1983), cita que a variação do padrão do florescimento tem grandes implicações, tanto na organização e estrutura da comunidade, como no fluxo gênico, o que é determinado, por exemplo, pelo comportamento do polinizador e pela evolução de estratégias reprodutivas.

TANNER (1982) estudou a biologia reprodutiva de 56 espécies de árvores de uma floresta montanhosa úmida da Jamaica e tentou correlacionar o sistema de reprodução com a diversidade de espécies presentes na referida floresta. Embora os dados não tenham sido suficientes para explicar a coexistência de muitas espécies, o autor fez análises sobre o tamanho das flores, tempo de duração da flor e da produção de néctar, observações fenológicas e de polinização.

BAWA et al. (1985) ressaltaram a grande heterogeneidade espacial e temporal das florestas tropicais, em que normalmente a densidade das árvores pode variar em diferentes estratos da floresta, ou diferir com a categoria sucessional e mencionaram que a análise dos sistemas reprodutivos deve ser feita levando em conta o estrato e a categoria sucessional. BAKER (1959), CONN et al. (1980), FREEMAN et al. (1980) apud BULLOCK (1985), correlacionaram o modo de reprodução com a forma de vida das plantas.

CRUDEN (1977), BAWA & WEBB (1983), URBANSKA (1984), WEBB (1984) e PHILBRICK & ANDERSON (1987), entre muitos outros, sugerem que a compreensão dos sistemas reprodutivos requer, além das análises habituais de polinizações controladas e naturais, a investigação minuciosa de alguns aspectos mais sutis, como o número de grãos de pólen por antera, a quantidade de néctar, a fertilidade dos grãos de pólen, o crescimento do tubo polínico, o número médio de grãos de pólen por óvulo, a medida do ovário, a determinação do período de receptividade do estigma, o tamanho dos grãos de pólen, entre outros aspectos.

À guisa de ilustração para o exposto, podemos men-

cionar o trabalho de BAWA & OPLER (1975), que acreditam que os registros sobre a incidência de dioiccia não condizem com a frequência real do fenômeno, havendo, no caso, uma ocorrência maior do que usualmente citado. Os autores em questão atribuem essa subestimativa do fenômeno ao fato de muitas flores terem partes pistiladas e estaminadas, mas apenas uma delas ser funcional. Estudos para melhor precisar essa situação teriam de ser complementados com a análise de viabilidade do pólen e dos óvulos.

BAWA & WEBB (1983), estudando flores hermafroditas de *Muntingia calabura* L, que crescem em ambientes perturbados da Costa Rica, verificaram que há uma considerável quantia de diferenciação sexual obtida através do desenvolvimento diferencial dos estames e pistilo. Os autores notaram que existiam três classes florais (flores com mais de 70 estames, flores com um número de estames entre 40 e 70, e flores com menos de 40 estames). À medida que aumenta o número de estames, diminui o tamanho do ovário e do estigma, e vice-versa. As flores com maior tamanho de ovário e estigma também produzem uma maior quantidade de néctar e, apesar de não haver grande variação, as flores com maior número de estames têm uma tendência mais elevada na média de grãos de pólen por antera. Isso indica que as flores, aparentemente hermafroditas, podem funcionar como flores masculinas ou como flores femininas, havendo então, um dimorfismo sexual que não é aparente à primeira vista.

O gênero *Manihot* tem as suas flores polinizadas por insetos, principalmente abelhas e vespas (ROGERS & APPAN, 1973; HERSHEY & AMAYA, 1982). Nas plantas entomófilas, as variações no gênero, tipo, ou atividade do inseto, podem trazer variações no sistema de cruzamentos da população vegetal, pois como as plantas entomófilas são visitadas por uma série de insetos, em que nenhum deles tem significância como vetor de pólen, pode, à medida em que há mudanças nas condições ecológicas, haver prejuízo para a atividade de um determinado inseto, o que resulta em mudanças no padrão da atividade do polinizador. Dentre as principais mudanças, podemos citar a temperatura, o regime pluviométrico, o suprimento alimentar e a atividade dos polinizadores (FRYXELL, 1957).

Por exemplo, TANNER (1982) encontrou, ao estudar os mecanismos reprodutivos das árvores de uma região montanhosa da Jamaica, uma alta incidência de autogamia e uma prevalência de polinização pelo vento, fato atribuído à escassez de polinizadores nas florestas da região, por se constituir de uma região muito úmida, nublada e fria. BAWA (1980), por sua vez, verificou em uma floresta da Costa Rica, onde a umidade é baixa, que 80% das espécies polinizadas por abelhas pequenas, ou por pequenos insetos oportunistas, eram dióicas, contra 20% que eram monóicas ou hermafroditas, ao passo que das espécies polinizadas por abelhas médias ou grandes, 25% eram monóicas ou hermafroditas, e apenas 1% era dióica.

Apesar de haver trabalhos recentes sobre os sistemas reprodutivos em florestas tropicais, ainda há muito o que esclarecer, pois, embora esses conhecimentos sejam escassos em florestas tropicais, devido à complexidade ambiental e ao grande tamanho das árvores (BAWA, 1974; BAWA et al., 1985; TARODA & GIBBS, 1982), eles são de interesse para os evolucionistas que lidam com florestas tropicais, por duas razões, segundo BAWA et al. (1985): nas florestas tropicais úmidas, os indivíduos de espécies relacionadas são muito espaçados, o que levanta a questão de qual seria o grau de autogamia e o de alogamia entre as espécies de árvores, e a extensão do movimento do polinizador; os métodos reprodutivos influenciam o fluxo gênico e a diferenciação genética das populações.

Além dos poucos trabalhos elucidativos sobre a taxa real de autopolinização ou de polinização cruzada (e os seus respectivos mecanismos) nas floras tropicais, também há poucos dados referentes à agamospermia. Assim é que MAGUIRE (1976) e JONG (1976) citam que a agamospermia deve ser um fato relativamente comum nas plantas tropicais e que há, com certeza, um número bem mais amplo de gêneros onde ela ocorre, do que poderíamos supor.

2.2.6. Vantagens Evolutivas e Ecológicas

De um modo geral, dentre a grande gama que existe nos sistemas de cruzamento, há vários graus de mistura da alogamia e autogamia, principalmente quando há combinação de hermafroditismo com auto-incompatibilidade. Assim, plantas auto-incompatíveis e com alogamia parcial, apresentam uma ampla faixa de taxa natural de cruzamento (GRANT, 1975). Apesar disso, há muita especulação para se entender o porquê da evolução da autogamia e quais as vantagens que a alogamia ou autogamia proporcionam às plantas.

O controle exercido sobre a reprodução sexual dentro de uma população, é conhecido como sistema de cruzamento e a variedade e a complexidade desse sistema é uma das mais notáveis características da reprodução sexuada, por facilitar a alogamia e evitar a autogamia e, nos vegetais, há uma série de processos alternativos desses sistemas (ANDERSON, 1937; DOBZHANSKY, 1951; BRIGGS & WALTERS, 1984).

A transferência do pólen pode ser evitada por barreiras estruturais e/ou fisiológicas (BRIGGS & WALTERS, 1984). Os primeiros estudos na tentativa de compreender essas barreiras foram de MÜLLER (1883) e KNUTH (1898) apud FRANKEL & GALUN (1977). Contudo, esses estudos de biologia floral, até meados do século XX, eram voltados apenas para o aspecto morfológico. Havia mais uma preocupação com o mecanismo floral do que com a dinâmica de polinização, propriamente. Atualmente, o enfoque funcional tem sido reconhecido como tendo maior importância nos estudos de polinização (STEBBINS, 1950; FRYXELL, 1957; FRANKEL & GALUN, 1977; LEWIS, 1979).

Uma questão que BAWA & OPLER (1975) levantam, é quanto ao fato de existir uma pressão para promover a alogamia, o que determina o desenvolvimento da dioicidia, ou da auto-incompatibilidade. Na tentativa de trazer alguma luz à essa questão, os autores propõem quatro condições que levam à alogamia, e poderiam ser sintetizadas da seguinte maneira:

(1) BAKER (1967) apud BAWA & OPLER (1975), sugere que é com relativa facilidade que se altera o sexo floral: o hermafroditismo passa para dioicismo, pois há envolvimento de mudanças genéticas e fisiológicas, enquanto a alteração para a auto-incompatibilidade é um processo complexo;

(2) sob certas condições, o dioicismo permite maior sucesso na polinização do que a auto-incompatibilidade;

(3) o dioicismo tem como consequência uma maior produção de sementes, enquanto ele pode promover um escape dos predadores de sementes;

(4) as espécies dimórficas exploram uma maior variedade de microhabitats do que as espécies monomórficas, o que favorece a seleção para o dioicismo.

WILSON (1982) atribui a origem da dioicia como sendo devida mais a condições ecológicas do que a fatores genéticos, e essa autora também enfatiza que a seleção pode favorecer a dioicia, quando o tamanho da população é reduzido. De acordo com BAKER (1959) apud BAWA (1974), e WILLIAMS (1975) apud ANDERSON & STEBBINS (1984), a dioicia é mais fácil de estabelecer-se em espécies que formam grandes clones e mantêm sua população por meio de reprodução vegetativa; a reprodução por sementes é relegada à exploração de novos habitats, pois se os indivíduos geneticamente diferentes são mais fáceis de se estabelecerem em habitats pouco favoráveis, a exploração se torna eficiente (ANDERSON & STEBBINS, 1984). BAKER (1984) apud FOX (1985), sugere que forças evolucionárias diferentes permitem o estabelecimento da dioicia.

ANDERSON & STEBBINS (1984), ao estudarem o porquê do estabelecimento da dioicia em detrimento da incompatibilidade, preocuparam-se especificamente com a auto-incompatibilidade gametofítica. Esses autores trabalharam com espécies de *Solanum* (Tourn.) L., em que há, na grande maioria, dicogamia e, em alguns casos, a incompatibilidade e a dioicia ocorrem para impedir a autogamia. Concluíram que a dioicia nas angiospermas

pode originar-se devido a uma variedade de diferentes tipos de pressão de seleção, dependendo do grupo considerado. Com a dioiccia, mais cruzamentos são legitimados, portanto, mais frutos são obtidos, e esse estabelecimento da dioiccia se faz particularmente mais importante nas seguintes condições: tamanho pequeno da população; população que consiste de indivíduos intimamente relacionados; população amplamente distribuída; polinização por insetos que não viajam a longas distâncias. Em todas as situações, haveria um aumento na probabilidade de cruzamentos dentro da população, logo, entre indivíduos mais intimamente relacionados.

Diversos autores sugeriram hipóteses distintas para explicar os possíveis fatores associados com a mudança evolucionária da alogamia para a autogamia. Esses fatores podem ser resumidos, como segue:

(1) Garantia reprodutiva: essa hipótese baseia-se na idéia de que, se as condições para a polinização cruzada não são favoráveis, pode ser desenvolvido o mecanismo para a autofertilização. Essas condições seriam promovidas por uma série de fatores, como:

- indivíduos autocompatíveis podem, com um único propágulo, iniciar uma colônia de reprodução sexuada, tendo um estabelecimento muito mais fácil do que se dois indivíduos auto-incompatíveis, porém, com compatibilidade entre eles, estiverem próximos (BAKER, 1955);

- na ausência de polinizadores, ou por condições climáticas, ou por haver baixa densidade populacional de plantas para atrair os polinizadores, o indivíduo pode formar sementes (BAKER, 1955);

- GRANT (1971) propôs a existência de uma pressão competitiva, envolvendo polinizadores: quando várias espécies congêneras estão crescendo simpatricamente, um deslocamento do indivíduo pode levar a espécie a mudar para a autogamia;

- isolamento reprodutivo durante a domesticação (JAIN, 1976)

(2) Balanço da adaptação - adaptabilidade: aqui, a base é a consequência genética da heterozigosidade, que assegura uma adaptação a curto prazo dos indivíduos em um ambiente variável (JAIN, 1976).

(3) Mecanismo de isolamento: novos genótipos são protegidos pelo isolamento, devido à criação de barreiras de isolamento (JAIN, 1976).

(3) Seleção automática para genes autógamos; se os autógamos podem contribuir com pólen para os outros, eles têm uma maior vantagem reprodutiva (JAIN, 1976).

O que tem sido a chave da questão do assunto do desenvolvimento da autogamia é que a mudança de um sistema multi-gênico de auto-incompatibilidade para um sistema de auto-compatibilidade, é relativamente simples, enquanto a situação reversa requer o acúmulo de uma série de eventos genéticos que raramente ocorrem (SOLBRIG, 1971), e muitos autores têm considerado que esse retorno à incompatibilidade é improvável (JAIN, 1976). Segundo PANDEY (1960), só no sistema gametofítico é que mudanças mutacionais produzem a auto-compatibilidade. Essa mudança envolve a perda unilateral da atividade da incompatibilidade original; a expressão fenotípica característica é perdida no pólen, enquanto é retida no pistilo, como se nenhuma mudança tivesse ocorrido (LUNDQUIST, 1968). Porém, a auto-compatibilidade não leva inevitavelmente à autofertilização extrema, e vários graus de polinização cruzada, dentro de espécies incompatíveis, permite a análise do controle dos sistemas de reprodução (RICK et al., 1978).

Conforme STEBBINS (1957), as evidências de que a autopolinização é uma condição derivada, seriam as seguintes:

(1) as espécies autógamas são mais especializadas em características morfológicas do que as espécies com ela relacionadas que possuem polinização cruzada;

(2) muitas espécies autógamas possuem estruturas que teriam um alto valor seletivo somente em conexão com a fer

tilização cruzada. Uma vez estabelecidas, essas estruturas tornam-se determinadas por uma combinação de genes essenciais para a atividade reprodutiva; logo, mesmo depois de ter havido a mudança da alogamia para a autogamia, tais genes não poderiam ter-se perdido, ou mesmo se modificados, sem afetar seriamente a vitalidade ou fertilidade da planta;

(3) a autogamia parece ter-se originado através de uma seleção artificial para a fertilidade com plantas cultivadas;

(4) diferentes gêneros da mesma família, ou de famílias intimamente relacionadas, que contêm espécies auto-compatíveis, geralmente têm uma base genética semelhante para a auto-incompatibilidade.

A questão que por muito tempo intrigou os geneticistas era o porquê do estabelecimento da autogamia, uma vez que DARWIN (1876, 1877) apud JAIN (1976) viu nesse evento uma vantagem só ocasional, sendo criada uma imagem negativa da autogamia, imagem essa reforçada com a genética dos híbridos, ou seja, era visto vantagem apenas na heterose.

Para DARLINGTON (1939), a evolução em direção à autogamia, foi um passo retrógrado do sistema sexual, devido à perda da variação e, também, pelo fato de ser uma situação que envolve vantagem apenas a curto prazo, quando da ocupação de habitats. A evolução da autogamia, repetidamente, e nas diversas classes de vegetais, talvez seja uma resposta à pressão de seleção em favor da adaptação imediata (STEBBINS, 1950). Apesar dessa visão negativa da autopolinização, ela tem se desenvolvido em várias espécies, cujo mecanismo de incompatibilidade tem sido suprimido por uma série de mutações dominantes, tornando-se possível a autofertilização (SOLBRIG & ROLLINS, 1977). Se essa alteração tem ocorrido repetidamente, então, o seu efeito nas populações não deve ser tão negativo como os primeiros estudiosos do assunto propunham, e uma visão mais ampla, voltada para o conhecimento do verdadeiro potencial dos indivíduos autocompatíveis e autógamos, começou a ser difundida. O conceito do sistema genético, integrando fatores ecológicos,

genéticos e de cariótipos, na estratégia evolucionária das espécies, abriu as portas para alguma vantagem adaptativa da autopolinização (JAIN, 1976).

A poliploidia também resulta na quebra do sistema de incompatibilidade gametofítica (JAIN, 1976). Embora esteja longe de ser clara a correlação entre poliploidia e autofertilização, em vários grupos de plantas anuais e bianuais, as espécies autopolinizadas possuem muitos indivíduos aloploplóides, enquanto as espécies de fertilização cruzada são estritamente diplóides. STEBBINS (1965) apud GIBBS et al. (1975), estudando espécies invasoras da Califórnia, mencionou que o alto grau, ou o baixo grau de ploidia, não parece ter qualquer relação com o hábito invasor. Todavia, as razões para a associação da poliploidia com a evolução da autogamia e hábito invasor, são várias. Com uma frequência relativamente alta de quiasmas, as espécies aloploplóides podem possuir um caráter pré-adaptativo, que pode facilitar a mudança da polinização cruzada para autogamia (GIBBS et al., 1975).

BARRETT (1982) cita que os principais fatores que promovem a estrutura genética e o nível de variação em uma população, são os fatores que regulam a recombinação, tais como: número de cromossomos, frequência de permuta, barreiras de esterilidade e de fertilidade, sistemas de cruzamentos, dispersão e estratégia evolutiva de vida das espécies. Conforme LEWIS & JOHN (1963) apud ARROYO (1973), a frequência de quiasmas pode ser matéria de seleção, que pode aumentar ou diminuir a quantia da variabilidade genética nas populações.

Em plantas alógamas, muitas vezes, a variabilidade maior é atingida dentro de linhas, e é menor entre linhas de uma população, enquanto em espécies autógamas, essa variabilidade pode ser maior entre linhas de uma população.

A maior variabilidade também pode ser atingida pelo índice de recombinação. A grande importância da análise do índice de recombinação para correlacioná-lo com o sistema reprodutivo, é baseado na idéia de DARLINGTON (1939), e que permanece até hoje. A autogamia ocorre muitas vezes como uma situação adaptativa imediata para um ambiente que está passando por al-

guma mudança ou distúrbio, então a variabilidade é compensada com a alta frequência de quiasmas.

ARROYO (1973) encontrou em espécies de *Limnanthes* R.B., que o aumento da frequência de quiasmas acompanhou a evolução da autogamia, o que permitiu um aumento na variabilidade devido à recombinação. Conforme ARROYO (loc. cit.), na espécie *L. floccosa* Howell., a autogamia evoluiu nas suas cinco subespécies, das quais duas são totalmente autógamas e três são parcialmente autógamas. A frequência de quiasmas nas subespécies parcialmente autógamas é bem inferior (7,40-8,93) se comparada com a frequência de quiasmas nas subespécies totalmente autógamas (8,95-10,20).

GIBBS et al. (1975) também encontraram em espécies de *Senecio* (Tourn.) L. uma taxa elevada de frequência de quiasmas correlacionada com a autogamia nas espécies *S. viscosus* L. e *S. vulgaris* L.. Essa correlação, por sua vez, não é tão forte quanto a encontrada por ARROYO (1973), pelo fato de que em *Senecio* há um aumento do número de cromossomos nas espécies autógamas, o que compensa o número de quiasmas. Segundo STEBBINS (1950), a frequência de quiasmas pode ser correlacionada com o tipo de sistema de cruzamento em espécies herbáceas que têm o mesmo número cromossômico. A correlação esperada é entre menor frequência de quiasmas e predomínio de alogamia e maior frequência de quiasma e predomínio de autogamia. Isso produz a variabilidade imediata.

A variação nas plantas autógamas passou a ser bastante investigada e as plantas invasoras constituem um excelente material para isso. O que se sustentou por muito tempo, foi que as populações que se autofertilizavam eram constituídas por indivíduos homozigotos, formando uma população quase que uniforme (BARRETT, 1982). Contudo, baseando-se na variação e condições de habitat, essas idéias vieram a mudar com MATHER (1943, 1953, 1973) apud JAIN (1976), através do conceito dos sistemas genéticos integrando uma variedade de fatores cariotípicos, genéticos e ecológicos na estratégia evolucionária de uma espécie. MATHER (loc. cit.) postulou que os autógamos ganham em termos de adaptação local por uns poucos genes homozigotos combinados, sacrificando a flexibilidade a longo prazo

(JAIN, 1976). Os estudos de variação de aloenzimas indicam que as espécies invasoras têm alto nível de variação nos loci polimórficos, e essa variação é interpopulacional (HAMRICK, 1983).

Apesar de, em alguns casos, como na evolução de *Lycopersicum hirsutum* autógama, terem raças autoincompatíveis mais uniformes se originando de biótipos auto - incompatíveis com grande variabilidade (RICK et al., 1979). ALLARD (1965) verificou, ao trabalhar com espécies autógamas e colonizadoras bem sucedidas, *Bromus mollis* L. e *Avena fatua* L. e com a alógama *Lolium multiflorum* Lam., que no padrão geral, a variabilidade genética total é pequena entre alógamos e autógamos, havendo, porém, uma tendência para os autógamos serem mais variáveis entre famílias e os alógamos mais variáveis dentro de famílias. GOTTLIEB (1977) e BROWN (1979) apud HAMRICK et al. (1979) demonstraram que espécies predominantemente de polinização cruzada, mantêm nível mais elevado de variação genética intra-população do que as predominantemente alógamas. As populações locais alógamas de *Festuca microstachys* Nutt. podem ser compostas por um grande número de diferentes genótipos e a maioria dos indivíduos é heterozigota em algum grau (KANNENBERG & ALLARD, 1967).

Os habitats abertos, em que predominam plantas herbáceas anuais, no início do estágio sucessional são influenciados por fatores físicos, tais como, temperatura e constituição do solo, e tendem a ser relativamente homogêneos (GRANT, 1975; HAMRICK et al., 1979). A colonização nos primeiros estágios sucessionais pode ser influenciada por uns poucos indivíduos (BAWA et al., 1985). Esses poucos indivíduos desempenham um papel pioneiro na comunidade aberta, havendo, naturalmente, uma demanda no seu sistema reprodutivo bem diferente da que existe em espécies que ocupam uma comunidade clímax (GRANT, 1975). EHRENFELD (1976) estudou a biologia da reprodução das espécies de *Euphorbia* L., *E. capitellata* Engelm., *E. albomarginata* Torr. & Gray e *E. hyssopifolia* L. e verificou que são invasoras, com uma longa estação de florescimento e crescimento rápido, e produção de sementes por plantas jovens. Esta combinação de características promove a variação genética necessária, ano após ano, e a uniformidade genética que favorece a rápida colonização a cada ano.

Para as espécies colonizadoras constituírem o mais rápido possível uma população, é preciso que o máximo de zigotos possuam uma combinação gênica favorável, e a recombinação tem que ser minimizada durante o período de expansão da nova população. Nesse caso, é preciso haver um equilíbrio entre adaptação e flexibilidade, e os requisitos para isso variam segundo o organismo (GRANT, 1975). Dependendo do organismo, que tenha uma forma de reprodução uniparental ou biparental, torna-se muitas vezes difícil de se distinguir, principalmente no segundo caso, o efeito do aspecto replicativo, pois o processo de crescimento da população e a troca gênica são combinados em espécies de organismos biparentais (GRANT, 1980).

Com base na classificação de CARSON (1957) a p u d GRANT (1975) sobre os sistemas de recombinação, as espécies pioneiras têm tendência à apomixia (agamospermia, ou reprodução vegetativa), ou à autogamia, havendo, portanto, um sistema fechado ou restrito de recombinação. As semelhanças fenotípicas e genotípicas entre os indivíduos de uma espécie podem ser resultado do crescimento, em número e em área de expansão, da população parental. Esta semelhança de indivíduos dentro da espécie é demonstrada por esse tipo de reprodução agamospérmica ou autógena (STEBBINS, 1971; GRANT, 1971, 1975, 1980).

STEBBINS (1950) viu a autofertilização como um meio para a produção e manutenção de um grande número de indivíduos bem adaptados geneticamente, semelhantes em habitats marginais e temporários; e interpretou o aumento da frequência de quiasmas como um meio para a população adaptar-se durante a sua fase inicial de colonização. Para ARROYO (1973), o aumento da recombinação potencial permite a flexibilidade nas populações autóginas, sem perda da uniformidade. Quando o nível de autogamia não é alto, o aumento da frequência de quiasmas deve sempre permitir um aumento na variabilidade genética. Sob estas circunstâncias, uma alta taxa de recombinação deve influenciar a evolução a curto e a longo prazos.

A abundante e ampla distribuição em diversos habitats são critérios de sucesso na colonização. As espécies colonizadoras são distribuídas em muitas famílias diferentes e apresentam uma grande diversidade com respeito a características

morfológicas e fisiológicas (ALLARD, 1965). Apesar dessa grande diversidade entre as invasoras, BROWN & MARSHALL (1981) apud BARRETT (1982) identificaram quatro características comuns a elas: autogamia, ou propagação clonal com alta capacidade reprodutiva; distribuição a uma ampla gama de habitats; formação ecotípica e poliploidia. Deve-se mencionar, que esse é um padrão bem definido para as regiões temperadas; nas regiões tropicais, a situação é bem diferente: por exemplo, a sucessão na floresta amazônica é feita por espécies arbóreas, perenes, logo, isso já não é totalmente aplicado. Segundo BAKER (1974) apud JAIN (1976), apesar de a autogamia ser incluída como uma das principais características de ervas daninhas, não é mais importante que a plasticidade, ou dispersão.

Em linhas gerais, a quantidade de recombinação nas espécies pioneiras, pode ser controlada na meiose, como já consideraram anteriormente, com exemplos nos gêneros *Lymnanthes* (ARROYO, 1973) e *Senecio* (GIBBS et al., 1975), por número cromossômico, frequência de permuta e por barreiras de esterilidade. Na fertilização, a recombinação pode ser controlada p o r sistemas de polinização, sistemas de cruzamento e mecanismos de isolamento, entre outros (GRANT, 1975). Em comparação com as espécies lenhosas, as herbáceas têm uma maior quantidade de recombinação por geração (GRANT, 1975).

À medida em que a sucessão avança, o ambiente biótico se torna importante e o habitat fica mais complexo e heterogêneo, a tendência geral é ir em direção ao aumento da variabilidade das espécies das comunidades mais complexas (HAMRICK et al., 1979). Essa variabilidade, muitas vezes, é buscada pelo aumento da frequência de polinização cruzada e diminuição do número de quiasmas.

Da mesma forma como a autogamia foi vista, no passado, como um passo retrógrado na evolução, e só atualmente se reconhece a importância filogenética do fenômeno, o mesmo ocorreu com a apomixia. Pelo fato da reprodução sexual, quando abandonada, ser um processo progressivo e irrevogável, devido à substituição da meiose por uma mitose precoce (DARLINGTON, 1939), os complexos apomíticos sempre foram vistos como "um fim de linha" na evolução.

Não existe razão para acreditar que a aquisição da reprodução apomítica seja um fator menor na vida evolucionária de um grupo de espécies, ou seja um bloqueio para a sua capacidade de colonizar um grande número de habitats. Isso deve-se ao fato de que em todos os complexos apomíticos, sempre há alguma população apomítica facultativa, ou sexual, que vez ou outra, enriquece o conjunto gênico estabilizado pelos apomíticos obrigatórios (STEBBINS, 1971). Ainda, se a variação genética em uma população for causada por mutação, e isso ocorrer em um ambiente uniforme, a reprodução sexual não confere vantagem alguma (SMITH, 1968).

A apomixia tem, como vantagem imediata, a manutenção de genótipos bem adaptados (GRANT, 1971). Essa perpetuação tem um significado bastante profundo, se for lembrado que muitos genótipos híbridos, sexualmente estéreis ou semi-estéreis, são mantidos às custas da reprodução vegetativa ou agamospérmica. Logo, a despeito de um fluxo gênico, a agamosperma pode ser encarada como um escape da esterilidade (STEBBINS, 1971 ; GRANT, 1971).

A apomixia tem se mostrado importante na evolução das pequenas categorias taxonômicas, isto é, nas categorias infragenéricas. Assim, ela é importante na variação a curto prazo. A longo prazo, entretanto, o fenômeno deixa de ser relevante.

2.2.7. Ocorrência dos Sistemas Reprodutivos em Euphorbiaceae e em *Manihot*

Em muitos casos a associação entre o sistema reprodutivo e a posição sistemática é bastante forte (BULLOCK, 1985) e, embora os aspectos ligados à polinização não sejam estudados em muitos grupos, as observações em *Hevea* e a análise de vários caracteres florais em Euphorbiaceae, têm sugerido que a polinização de muitas espécies dessa família é conduzida, principalmente, por pequenos dípteros. Entretanto, embora seja comum a citação de que as Euphorbiaceae são polinizadas pelo vento, só

alguns gêneros, como *Acalypha* L. e *Ricinus* parecem ser verdadeiramente anemófilos (WEBSTER, 1967). Em *Mabea occidentalis* Benth. foi detectado o primeiro caso de polinização por morcego em Euphorbiaceae (STEINER, 1983). O método usual de polinização em *Manihot* é por insetos, em cujo corpo o pólen se adere. Muitos hymenópteros e foraminíferos visitam as flores. As inflorescências são monóicas ou dióicas e tipicamente alógamas. Em muitas espécies, há uma acentuada protoginia nas inflorescências (ROGERS & APPAN, 1973).

BULLOCK (1985), analisando a associação dos sistemas reprodutivos com a sua ocorrência em grupos taxonômicos em uma floresta tropical decídua, no México, encontrou 13 famílias monóicas, mas nas famílias Euphorbiaceae e Cucurbitaceae é que se encontrou concentrada a totalidade das espécies monóicas (71%).

Embora observações em *Euphorbia* L. e *Phyllanthus* L. sugiram uma ampla distribuição de autocompatibilidade em Euphorbiaceae, principalmente em herbáceas, e, embora haja poucos registros sobre incompatibilidade nas espécies dessa família, WEBSTER (1967) e MUENCHER (1936) apud GODLEY (1955) detectaram auto e alo-incompatibilidade em *Euphorbia cyparissias* L.. Este foi o primeiro experimento que demonstrou que a incompatibilidade pode ocorrer em espécies monóicas, o mesmo tendo sido verificado em *Hevea brasiliensis* (GODLEY, 1955).

Em *Ricinus*, os ramos basais da inflorescência possuem flores exclusivamente estaminadas e, os ramos apicais, flores pistiladas, mas, às vezes, todos os ramos da inflorescência diferenciam flores estaminadas e pistiladas. Embora difícil de analisar a herança dos fatores que governam esse tipo de sexualidade, SHIFRISS (1956, 1960) apud GEORGE & SHIFRISS (1967), concluiu que o padrão das flores nas inflorescências é o resultado da combinação dos genes para a feminilidade, que mantêm as flores femininas agregadas com os genes que mantêm as flores masculinas, que são sempre dispersas.

O dioicismo também é um evento raro nas Euphorbiaceae. Quando ele ocorre na família, predomina sempre nos mesmos gêneros, como no caso do gênero *Bernardia*, em que há espê-

cies dióicas, segundo BAWA (1974), OPLER & BAWA (1978) e BULLOCK (1985). Entre 64 espécies de Euphorbiaceae de uma reserva florestal de Jalisco (México), cerca de 14 espécies eram dióicas, distribuídas entre os seguintes gêneros: *Adelia* L., *Astrocasia* Robinson & Millsp., *Bernardia* Houst. ex P.Br., *Colaendondon*, *Croton* L., *Jatropha* L., *Margaritaria* L. e *Savia* Willd. Desses gêneros, *Jatropha* é que teve a maior incidência de espécies dióicas. Em termos de forma de vida, a dioicia predominou nas espécies arbóreas (BULLOCK, 1985). BAWA et al. (1985) e em uma floresta tropical úmida verificaram que entre 14 espécies de Euphorbiaceae, 9 eram dióicas.

TANNER (1982), ao estudar o sistema reprodutivo em uma floresta de uma região montanhosa da Jamaica, encontrou 6 espécies que variavam como dióicas, monóicas ou polígamas, e registrou *Alchornea latifolia* Sw. como dióica, mas ressaltou ser esta uma das espécies que variam em termos de sistema reprodutivo. SOBREVILA & ARROYO (1982), ao verificarem os sistemas reprodutivos em uma floresta da Venezuela, também registraram *Alchornea* sp como dióica.

Em *Manihot*, o dioicismo se faz presente na Seção *Stipulares*, nas espécies *M. stipularis* Pax, onde raramente se encontram inflorescências monóicas, e em *M. longipetiolata* Pohl, onde o monoicismo também é raro (ROGERS & APPAN, 1973; NASSAR, 1978b), e em *M. pusilla* Pohl (NASSAR, 1978b).

A agamospermia do tipo embrionia adventícia em Euphorbiaceae, foi pela primeira vez registrada por SMITH (1841) apud STEBBINS (1941), em *Alchornea ilicifolia* Muell. Arg., com a formação de embrião nucelar (freqüentemente com poliembrionia) e embrionia adventícia foi demonstrada em *Euphorbia dulcis*. A apomixia gametofítica, entretanto, não foi registrada em Euphorbiaceae (WEBSTER, 1967).

2.3. Barreiras Interespecíficas em *Manihot*

As barreiras existentes entre as espécies, para serem bem conhecidas, requerem estudos sistemáticos cuidadosos e estudos citogenéticos (STEBBINS, 1950). Apesar das divergências que existem em torno do conceito de espécie, há, entre os diversos autores, uma concordância de que as espécies que se reproduzem sexuadamente são delimitadas por mecanismos de isolamento que impedem, ou restringem bastante, a troca de genes entre membros de espécies diferentes (STEBBINS, 1950; GRANT, 1975). LEVIN (1979) prefere considerar os mecanismos de isolamento não como propriedade de simples espécies ou populações. Eles só se tornam importantes quando populações relacionadas diferem nesse aspecto.

A grosso modo, os mecanismos de isolamento podem ser impostos por barreiras externas, que seriam aquelas relacionadas tanto com o ambiente como com adaptações estruturais das flores, ou ser imposto por barreiras internas, que estariam ligadas aos aspectos cromossômicos e genéticos. Essa classificação, por sua vez, pode trazer alguns problemas na inclusão de tipos intermediários de barreiras (STEBBINS, 1950).

Quanto às barreiras externas, os mecanismos florais de isolamento constituem uma barreira para a polinização interespecífica imposta por isolamento etológico ou mecânico (GRANT, 1949).

O isolamento etológico é determinado pela constância de polinizadores em freqüentar um só tipo de flor (GRANT, 1949). Porém, muitas vezes, a vantagem seletiva pode não ser impedir o cruzamento interespecífico, mas reduzir a atividade de polinizadores estranhos, no sentido de economizar pólen ou nêctar. Esse caso poderia ser exemplificado com o gênero *Dalechampia*, que tem espécies polinizadas por abelhas do gênero *Euglossine*. Em *D. spathulata*, os machos do gênero *Euglossine* são atraídos por substâncias aromáticas secretadas pelas glândulas extraflorais e, em *D. magnistipulata*, as fêmeas do gênero *Euglossine* são atraídas por resinas secretadas por glândulas

homólogas às da espécie *D. spathylata*. As bracteas de *D. magnistipulata* abrem e fecham em ritmo diurno regular, sugerindo a restrição da atividade do polinizador, pois elas permanecem abertas por menos de duas horas. Talvez haja algum benefício energético para a planta em proteger o pólen. Da mesma maneira, a restrição da coleta da resina também pode reduzir o custo energético de manter um suprimento de resina constante. Porém, a vantagem mais importante pode ser aquela que fixa o tempo e a disponibilidade de um recurso que monopoliza a atenção da abelha e fixa a forma da constância floral (ARMBRUSTER & WEBSTER, 1979).

Os mecanismos de isolamento mecânico constituem uma barreira para a polinização interespecífica, impostos por modificações estruturais das flores, que impedem o pólen de uma espécie crescer no estigma da outra (GRANT, 1949). Tais mecanismos podem ser determinados geneticamente, sendo ou não reconhecidos externamente (DOBZHANSKY, 1951), como hermafroditismo (incluindo heterostilia), monoicismo, andromonoicismo e ginomonoicismo, que podem ser vistos como padrões diferentes de alocação de recursos às funções paterna e materna para otimizar o sucesso reprodutivo em diferentes caminhos (B A W A & BEACH, 1981).

Em *Manihot*, apesar de a literatura corrente não considerar a existência de barreiras interespecíficas, devido ao assincronismo no florescimento das espécies e sobreposição de área geográfica (ROGERS, 1962; CRUZ, 1968; NASSAR, 1980), acreditamos que é necessário uma maior investigação a esse respeito, principalmente no tocante a estudos fenológicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Foram utilizadas em nosso trabalho, as seguintes espécies:

(a) Seção *Heterophyllae* Pax emend. Rogers & Appan

- *M. pilosa* Pohl, de ocorrência em matas secundárias, margens de riachos e em solos arenosos, ricos em detritos vegetais, ocorrendo a uma altitude de cerca de 1500 m.

(b) Seção *Tripartitae* Rogers & Appan

- *M. tripartita* (Sprengel.) Muell. Arg. emend. Rogers & Appan, subsp. *tripartita*, ocorrendo em margens de florestas, em regiões rochosas e em cerrados, predominando em altitudes superiores a 1000 m.

(c) Seção *Manihot*

- *M. esculenta* Crantz, cultivada em todas as regiões.

M. pilosa e *M. tripartita* não são simpátricas na natureza, mas tanto uma como outra, podem ocorrer em simpatria com *M. esculenta*. As duas espécies selvagens não tuberizam, enquanto que a cultivada forma túberes.

3.2. Métodos

3.2.1. Estabelecimento de um Campo de Cultivares

A fim de se ter plantas dos cultivares, exclusivamente para fornecer material para este trabalho, foi cedida pela Seção de Raízes e Tubérculos do Instituto Agronômico de Campinas (SP), uma área na Fazenda Experimental "Theodoreto de Camargo" e 20 manivas-semente de um só genótipo da espécie *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' e 20 manivas-semente da 'Taquari'. Os cultivares foram plantados em setembro de 1980, pelo sistema de manivas de 20,0 cm colocadas na posição inclinada. A distância mantida entre as plantas foi de 2,0m x 2,0m, havendo para cada cultivar cerca de duas linhas com 10 plantas em cada linha.

3.2.2. Replântio do Campo de Cultivares

Devido ao grande porte vegetativo das plantas, elas foram removidas e o terreno preparado para o replântio em setembro de 1981. De cada cultivar em estudo, foram escolhidas as melhores ramas, isto é, isentas de bacteriose ou pragas, e cortadas em um comprimento de cerca de 20,0 cm. O corte para a obtenção de manivas-semente foi feito por uma serra elétrica, que além de uniformizar o tamanho das manivas, evita problemas de traumatismos mecânicos nas extremidades das manivas, como é comum quando o corte é feito com facão, tornando as manivas inutilizadas (NORMANHA & PEREIRA, 1950; CONCEIÇÃO, 1981). Uma vez obtidas as 40 manivas-semente (20 de cada cultivar), foram plantadas em posição inclinada, conforme o método usual, mantendo-se uma distância de 2,0m x 2,0m entre as plantas.

3.2.3. Estabelecimento da Coleção de Espécies Selvagens

As espécies utilizadas no presente estudo, *M. pilosa* e *M. tripartita*, foram mantidas em coleção em uma área cedida pela Seção de Citologia no Parque do Instituto Agronômico de Campinas (SP), distante aproximadamente 4,0 km da Fazenda Experimental "Theodoreto de Camargo", onde se encontravam os cultivares.

Foram coletadas 8 plantas inteiras da espécie *M. pilosa* na localidade de Campos do Jordão (SP), em maio de 1978, e plantadas no Parque do Instituto Agronômico de Campinas (SP), com espaçamento de 2,0m x 2,0m. Mas apenas 3 plantas se adaptaram e puderam ser utilizadas, o que nos dá um tamanho reduzido de amostra.

A espécie *M. tripartita* já se encontrava sob a forma de cultivo na área utilizada para o estabelecimento da coleção. Essa espécie estava representada por apenas 2 indivíduos, de procedência desconhecida e, segundo informações verbais, a espécie *M. tripartita* foi ali plantada por volta do ano de 1964.

Anualmente, as espécies eram podadas entre os meses de maio e junho.

3.2.4. Fenologia

Para os estudos de fenologia, foram acompanhados três ciclos de florescimento, correspondentes aos anos de 1980/81, 1981/82 e 1982/83. Tais estudos foram desenvolvidos da seguinte maneira:

- durante cada um dos ciclos de florescimento, as observações foram feitas duas vezes em cada mês, isto é, em meados do mês e no final do mês, e em um intervalo aproximado de 15 dias;

- as observações foram realizadas conforme o seguinte critério estabelecido: em cada ramificação das plantas, foram escolhidas inflorescências jovens, que aparentemente se encontravam no mesmo estágio de desenvolvimento. Para a caracterização de tal estágio de desenvolvimento, foram levados em consideração os seguintes aspectos : tamanho grande dos botões masculinos e femininos e intensidade da coloração dos botões. Optou-se por inflorescências que não se mostravam atacadas por moscas ou fatores de injúria. Todas as inflorescências contadas foram eliminadas a seguir, a fim de evitar-se repetições de contagem;
- o número médio de inflorescências em cada ano, foi calculado levando-se em consideração as duas contagens do mês e o número de plantas de cada espécie envolvida nas observações;
- foram construídas tabelas contendo o número médio de inflorescências por mês, em cada ano e em que o ciclo do florescimento foi acompanhado. Foram também construídas tabelas contendo o número médio de inflorescências por mês, nos três ciclos de florescimento estudados. Foram, ainda, preparadas figuras mostrando o florescimento para cada espécie.

A média de botões masculinos e femininos na inflorescência de cada espécie selvagem e cultivares utilizados para os estudos, foi calculada após terem sido coletadas 100 inflorescências de cada espécie e de cada cultivar, e realizada a contagem de botões masculinos e femininos em cada inflorescência. Tal coleta foi efetuada no mesmo dia, a fim de se evitar influências de temperatura e umidade.

Dados referentes à média de temperatura (°C) e o volume médio de chuva, durante os meses em que se acompanhou o florescimento nos diversos anos, foram fornecidos pela Seção de Climatologia do Instituto Agrônomo de Campinas.

3.2.5. Estudo do Horário de Abertura das Flores Masculinas e Femininas

Para as duas espécies e os dois cultivares de *Máni hot* foram isoladas inflorescências com flores masculinas e femininas, em dia de antese, e tais flores foram etiquetadas e protegidas por sacos de papel manteiga branco. A cada uma hora, a partir das 6 horas até às 17 horas, as flores femininas eram observadas quanto a:

(1) estágio de abertura - Aqui foram consideradas três classes:

- . fechadas (F)
- . parcialmente abertas (PA)
- . totalmente abertas (TA)

(2) receptividade do estigma - Obteve-se, como parâmetro, a exsudação de uma substância líquida no estigma, a qual vai aumentando em intensidade e se tornando branca e brilhante, à medida que a flor vai se abrindo. Baseando-se na intensidade e no viço dessa substância, foram-lhes atribuídas notas:

- . ruim (0)
- . boa (1)
- . ótima (2)

As observações realizadas nas flores masculinas foram da seguinte ordem:

(1) estágio de abertura - Foram consideradas três classes:

- . fechadas (F)
- . parcialmente abertas (PA)
- . totalmente abertas (TA)

(2) posição dos estames:

- . descidos (D)
- . erguidos (E)

Esse critério para a posição dos estames foi estabelecido, porque os estames encontram-se como que enovelados na porção basal da flor, no início da antese; com o progredir desta, eles vão se tornando eretos. Durante o processo de fechamento da flor, novamente eles vão se tornando curvos até a região basal da flor.

Tanto para as flores masculinas quanto para as flores femininas, foram montadas tabelas contendo as informações do estágio de cada flor, em cada horário. Para uma melhor visualização, foram construídas figuras para cada espécie e para cada cultivar, contendo cada figura três curvas referentes ao estágio de abertura das flores (masculinas e femininas) e receptividade do estigma. Nas coordenadas das figuras, foram colocadas informações sobre a média de flores totalmente abertas e receptividade ótima do estigma e respectivos horários de observação.

3.2.6. Teste para a Agamospermia

Foram protegidos botões femininos das espécies *M. pilosa* e *M. tripartita* e dos 'Branca de Santa Catarina' e 'Taquari' da espécie *M. esculenta*. As proteções foram feitas em inflorescências emasculadas, como garantia para evitar as contaminações - apesar da protoginia. Os botões femininos foram protegidos cerca de 2 a 3 dias antes da abertura da flor, para que não ficassem cobertos durante o início do seu desenvolvimento, o que poderia acarretar alterações desenvolvimentais ulteriores.

As proteções foram feitas com sacos de papel manteiga branco, amarrados com etiquetas de cartolina contendo informações de data e de quantidade de botões protegidos. Optou-se por este tipo de papel, por duas razões: (1) ele permite a respiração dos botões; (2) a cor branca permite a passagem de luz em intensidade razoável. A fim de uma maior segurança, para que não entrasse nenhum inseto de pequeno porte (tal como pequenas formigas), que pudesse eventualmente contaminar as flo

res com pólen, os sacos de papel manteiga branco tiveram suas emendas de cola reforçadas com tiras de papel "Contact" branco. Este tipo de papel também foi colocado por toda a volta dos sacos de papel manteiga, aderindo-os ao ramo da planta.

Foi elaborada uma tabela apresentando o número de flores utilizadas para cada espécie e cada cultivar, bem como, a quantidade de frutos produzidos, ou ovários desenvolvidos, além da quantidade de sementes totalmente formadas, ou em início de formação. Análises estatísticas acompanham os resultados. Deve-se esclarecer que o termo "ovário desenvolvido" refere-se à condição de ter havido, após abertura da flor e caída do estigma, um desenvolvimento do ovário, quer em diâmetro, quer em comprimento, porém que cessa 15 dias após a antese.

3.2.7. Polinizações

Foram efetuadas polinizações cruzadas entre as espécies *M. pilosa* e *M. tripartita* e, ainda, entre essas espécies e os 'Branca de Santa Catarina' e 'Taquari'. Também foram efetuadas polinizações entre esses dois cultivares.

Autopolinizações foram feitas envolvendo as espécies *M. pilosa*, *M. tripartita* e os 'Taquari'.

Para os cruzamentos, utilizou-se a seguinte técnica: apesar da protoginia, emascularam-se as inflorescências das plantas utilizadas como parental feminino, para uma maior segurança. Geralmente, cada flor masculina era utilizada para polinizar duas a três flores femininas (CONCEIÇÃO, 1981; HERSHEY & AMAYA, 1982). Para se fazer as polinizações, procedeu-se da seguinte maneira: os botões femininos, em véspera de abertura, foram protegidos com sacos de papel manteiga branco, a fim de evitar-se uma possível contaminação quando da abertura da flor. O reconhecimento prático do botão em véspera de antese pode ser feito, baseando-se no seu tamanho e na sua coloração (HERSHEY & AMAYA, 1982). Para assegurar - se quantias suficientes de pólen no mesmo dia da antese dos botões femininos, utilizou-se dois procedimentos: (1) foram protegidos botões mas

culinos no dia da antese. As proteções também foram feitas com sacos de papel manteiga branco; (2) foram coletados botões masculinos, em véspera de antese, ou até dois dias antes da abertura, e conservados em placas de Petri contendo, como substrato, papel filtro umidecido em água corrente. As placas foram mantidas em temperatura ambiente e o uso desse material sempre foi feito em um prazo máximo de 24 horas (CONCEIÇÃO, 1981).

Quanto às autopolinizações, a técnica utilizada foi a mesma descrita no parágrafo anterior, para polinização cruzada, exceto quanto ao fato de que as inflorescências não foram emasculadas.

De um modo geral, o preparo das inflorescências dos cultivares para a polinização, era feito no período da manhã, e os cruzamentos eram efetuados entre 13 e 16 horas. Para as espécies selvagens, o preparo das inflorescências normalmente era realizado no final da tarde; as polinizações em *M. tripartita* eram executadas entre 8 e 12 horas e, na espécie *M. pilosa*, as polinizações foram feitas entre 13 e 15 horas. As polinizações eram realizadas nesses horários por ter sido observado serem os de maior receptividade do estigma e liberação de pólen, como será visto nos resultados.

Quando os cruzamentos envolviam espécies e cultivares, os botões masculinos eram transportados do Instituto Agrônomo de Campinas para a Estação Experimental "Theodureto de Camargo", ou vice-versa, em placas de Petri contendo papel de filtro umidecido em água corrente.

3.2.8. Coleta de Material

Visando o estudo da microsporogênese, megagametogênese e megasporogênese, foram coletados, respectivamente, botões masculinos e femininos de 'Branca de Santa Catarina' e 'Taquari', e das espécies *M. pilosa* e *M. tripartita*, segundo os critérios abaixo:

- microsporogênese: foram coletados botões masculinos jovens, de cerca de 0,5 mm de comprimento;
- viabilidade do pólen: os botões masculinos foram coletados no dia da antese, quando os grãos de pólen já se encontravam liberados;
- megagametogênese e megasporogênese: foram coletados botões antes da abertura da flor e após a abertura da flor, como segue:

(a) botões coletados anteriormente à antese da flor — após serem retiradas as tépalas, o estigma e o disco do ovário, os botões foram medidos em comprimento e separados, para maior facilidade de referências nos resultados, em três classes de tamanho. A separação em tais classes foi aleatória.

Classes de Tamanho:

- . botões pequenos — variando até 1,50 mm de comprimento
 - . botões médios — variando de 1,51 mm a 2,50 mm de comprimento
 - . botões grandes — com comprimento superior a 2,51 mm.
- (b) botões coletados após a antese da flor — foram coletados botões oriundos de polinizações controladas e botões não polinizados, conforme vem a seguir:
- . botões polinizados: as polinizações foram efetuadas conforme o descrito no item 3.2.7 e depois os botões eram coletados com 24 horas e com 48 horas após a polinização;
 - . botões não polinizados: foram coletados botões no dia da abertura da flor e em dias subsequentes, até 15 dias após a antese.

Ao invés de se utilizar medidas para esses botões, preferiu-se separá-los por classes de idade, con

siderando o dia da antese como ponto de referência. Optou-se por este critério, devido ao fato de o desenvolvimento dos óvulos variarem para cada ovário. Assim, o tamanho do ovário está ligado diretamente ao número de óvulos desenvolvidos ou não (dois ovários com a mesma idade têm tamanhos diferentes em função do número de óvulos desenvolvidos).

3.2.9. Fixação do Material

- Botões Masculinos

Para os estudos de viabilidade, medidas e contagem dos grãos de pólen por antera, e comportamento meiótico, os botões masculinos foram fixados em Carnoy, fixador este, preparado imediatamente no momento de uso. O seu preparo consiste em uma mistura de álcool absoluto - ácido acético glacial, na respectiva proporção de 3 : 1. O material foi mantido por 15 minutos no vácuo, para uma boa fixação. Após 24 horas, o fixador foi renovado e o material estocado à temperatura de -20°C (MEDINA & CONAGIN, 1964).

O material utilizado para estudar os estágios de desenvolvimento do grão de pólen foi fixado em fixador Craff, preparado antes do início da fixação. Este fixador consiste de duas soluções (A e B), que são misturados na proporção de 1 : 1 (Solução A = água destilada e formol; Solução B = água destilada, ácido acético e ácido crômico). Os botões foram mantidos por 30 minutos no vácuo, para garantir a penetração do fixador. Após 24 horas, o material foi lavado em água destilada, mantido por duas horas em álcool 50%, para iniciar a desidratação, e posteriormente, foram transferidos para álcool 70% e estocados a temperatura ambiente (JOHANSEN, 1939; MEDINA & CONAGIN, 1964; BEÇAK & PAULETE, 1976).

- Botões Femininos

Um lote de botões femininos destinados ao estudo

da megagametogênese e megasporogênese, também foi fixado em Crafi. Um outro lote, também destinado a estes estudos, foi fixado em FPA₅₀. Para tanto, foram retirados os óvulos do ovário (com auxílio de lupa e estiletes), e colocados no fixador. Uma vez postos os óvulos no FPA₅₀, eles foram mantidos no vácuo por 15 minutos e conservados por 24 horas a uma temperatura de 0°C. Após esse período de 24 horas, o material foi removido para o álcool 70% e estocado a 0°C.

3.2.10. Crescimento do Tubo Polínico

A título de se acompanhar o crescimento do tubo polínico, colocaram-se os botões femininos no dia de antese e m placa Petri contendo ágar a 2%. Em seguida, foram executadas as polinizações e o material coletado após os seguintes tempos de polinizações: 2 horas, 4 horas, 6 horas, 24 horas. Realizava-se a fixação, imediatamente após a coleta, em FAA (formol : ácido acético : álcool 80%, nas respectivas proporções de 1 : 1 : 8) (LEVIN & BERUBE, 1972).

3.2.11. Preparo de Lâminas

3.2.11.1. Lâminas Temporárias

Para os estudos de viabilidade, medida e contagem do número de grãos de pólen por antera, foi utilizada a técnica de coloração por carmim acético. Para o estudo do comportamento meiótico, foi usado o método de coloração com carmim acético, aquecimento rápido em chama, e esmagamento (MEDINA & CONAGIN, 1964).

Para o crescimento do tubo polínico, os ovários, após os diferentes períodos de polinização citados no item 3.2.10., foram cortados longitudinalmente, à mão livre, e mantidos por 10 minutos a 60°C, em uma solução 1 : 1 de Fucsina 1% : Verde Rápido. Após esse período, foi transferido para ácido láctico 85% e mantido por 20 minutos, também a uma temperatura de

60°C. Depois disso, cada metade de ovário foi colocada na lâmina, com algumas gotas de ácido lático 85%, e sobre ele foi posta a lamínula. Esta foi pressionada lentamente, até se conseguir esmagamento do material (LEVIN & BERUBE, 1972). Uma técnica alternativa foi utilizada: os ovários polinizados e cortados longitudinalmente, à mão livre, foram mantidos por uma hora em HCL 1N, a uma temperatura de 60°C. Em seguida, o material foi transferido para a solução de Fucsina 1% : Verde Rápido (1 : 1) e mantido nessa solução por 10 minutos, à temperatura de 60°C. Ainda a 60°C, o material foi transferido para ácido lático 85% e aí mantido por uma hora. A seguir, as lâminas foram montadas conforme descrito no parágrafo anterior (LEVIN & BERUBE, 1972).

O lote de óvulos pré-fixados em FPA₅₀, conforme descrito no item 3.2.9 (fixação de material), foi colocado em um líquido composto de ácido lático 85% : hidrato de cloral : formol : óleo de cravo : xilol, nas respectivas proporções de 2 : 2 : 2 : 2 : 1 (por peso), para diafanização. O material foi separado em porções e cada porção mantida em solução clarificadora durante os seguintes períodos de tempo: 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas e 24 horas. Após cada um desses períodos de tempo, os óvulos eram colocados em lâminas e observados ao microscópio, em contraste de fase (HERR, 1971). Foram executados dois processos alternativos para a clarificação, sendo eles:

- modificação da solução clarificadora

A solução foi modificada para ácido lático 85% : hidrato de cloral : formol : óleo de cravo : xilol, nas respectivas proporções de 2 : 2 : 2 : 2 : 2 (por peso);

- desidratação

Os óvulos estocados em álcool 70%, foram submetidos a uma desidratação em álcool 100%, por 15 minutos em cada álcool, antes de serem colocados na solução clarificadora.

3.2.11.2 Lâminas Permanentes

Os botões masculinos e femininos fixados em Craf e estocados em álcool 70% foram incluídos em parafina e, à inclusão, sucedeu-se o seguinte processo: foi montada uma bateria, com 8 soluções:

- . Solução 1 - água destilada 20 cc; etanol 70 cc
- . Solução 2 - água destilada 10 cc; etanol 80 cc
- . Solução 3 - água destilada 5 cc; etanol (90%) 50 cc;
álcool butílico terciário 35 cc
- . Solução 4 - água destilada 5 cc; etanol (90%) 40 cc;
álcool butílico terciário 50 cc
- . Solução 5 - etanol (100%) 25 cc; álcool butílico terciário
75 cc
- . Solução 6, Solução 7 e Solução 8 - álcool butílico terciário.

Os ovários foram deixados por exatamente uma hora nas soluções 1, 2, 3, 4 e 5 e, por exatamente duas horas nas soluções 6, 7 e 8. Em seguida, transferiu-se o material para um becker contendo um pouco de parafina e álcool butílico, sendo mantido por uma noite sobre a estufa. No dia seguinte, o becker foi colocado dentro da estufa e eram feitas trocas, com acréscimo de parafina a cada uma hora, durante um período de seis horas. Uma vez incluído o material, efetuou-se o corte em micrótomo, a uma espessura de $12\mu\text{m}$. O material cortado foi aderido a lâminas contendo um esfregaço de albumina (JOHANSEN, 1939; MEDINA & CONAGIN, 1964).

Deve-se assinalar que os botões masculinos foram cortados transversalmente e, os femininos, longitudinalmente.

A coloração das lâminas foi precedida inicialmente por uma hidratação: xilol, etanol 100%, etanol 50%, etanol 30%. As lâminas foram mantidas por cinco minutos em cada cuba. Posteriormente, foram feitas algumas lavagens em água destilada, por aproximadamente 10 minutos cada lavagem, e transferidas pa

ra uma solução de alúmen de ferro a 4%, por duas horas. Em seguida, novas lavagens em água destilada foram realizadas, desta vez, por trinta minutos cada lavagem e, então, transferiram-se as lâminas para a hematoxilina fêrrica de Heidenheim, por 12 horas. Retiradas da hematoxilina, as lâminas foram mantidas em água destilada e, depois de uma hora, foi executada a diferenciação em alúmen de ferro a 2%. Posteriormente ao processo de diferenciação, foram efetuadas novas lavagens em água destilada e, a seguir, as lâminas sofreram uma desidratação, utilizando-se, então, o processo inverso ao descrito no início deste parágrafo. Finalmente, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá (JOHANSEN, 1939; MEDINA & CONAGIN, 1964).

3.2.12. Medida dos Grãos de Pólen

Para se verificar a medida dos grãos de pólen das espécies e dos dois cultivares envolvidos no presente trabalho, utilizou-se 10 flores masculinas e mediu-se o diâmetro de cem grãos para cada espécie e para cada cultivar. Os campos das lâminas foram escolhidos aleatoriamente. Em seguida, foram elaboradas figuras, indicando o número de grãos de pólen para cada intervalo de 5 μ m.

3.2.13. Contagem de Grãos de Pólen por Verticilo

Para cada espécie e para cada cultivar, foram contados, em cada antera (dez anteras) de dez botões, o número de grãos de pólen férteis por antera no verticilo superior (total de cinco anteras) e no verticilo inferior (total de cinco anteras). Foi também calculada a média de grãos por antera, independente do verticilo e levando em consideração o verticilo. Montou-se uma tabela para a apresentação dos resultados acompanhados da devida análise estatística.

3.2.14. Identificação da Substância de Reserva

A fim de se identificar a substância de reserva do núcleo e saco embrionário, utilizaram-se os seguintes corantes específicos:

- . Lugol - específico para amido
- . Iodina com KI - específico para amido
- . Sudan IV - específico para lipídeo (embora as chances de ser lipídeo fossem mínimas (PURVIS et al., 1964)).

Os corantes foram aplicados sobre as lâminas que haviam sido desparafinizadas com xilol. Após se colocar algumas gotas de corante, as lâminas foram montadas em água e, após 3 minutos, examinadas.

Além dos testes com corantes, as lâminas prontas (isto é, as coloridas com hematoxilina férrica de Heidenheim) foram submetidas a microscópio com luz polarizada para verificar se havia desvio no plano da luz, o que indicaria a presença de cristais.

4. RESULTADOS

4.1. Florescimento

4.1.1. Horário de Antese das Flores

Ao observarmos a antese das flores masculinas e femininas, e as respectivas posições dos estames e grau de receptividade do estigma em cada horário de observação, verificamos que, nas nossas condições de trabalho, a espécie *M. tripartita* (Tabela 1) tem um comportamento discrepante em relação à espécie *M. pilosa* (Tabela 2) e aos cultivares de *M. esculenta* "Branca de Santa Catarina" e "Taquari" (Tabelas 3 e 4 respectivamente).

Pela Tabela 1, podemos observar que a espécie *M. tripartita* deve iniciar a antese bem cedo, pois às 6 horas as flores masculinas e femininas já se encontravam abertas e os estames erguidos, ou seja, em posição em que a liberação do pólen já acontece. Contudo, só a partir das 9 horas é que o estigma possuía uma receptividade ótima (grau 2). Como podemos verificar na Tabela 1, às 11 horas se inicia o processo de fechamento das flores masculinas, seguido, às 13 horas, das flores femininas, o que indica que *M. tripartita* tem um comportamento reprodutivo predominantemente matutino.

A espécie *M. pilosa* (Tabela 2), por sua vez, tem um comportamento de antese que começa às 8 horas, com flores femininas, seguido, às 9 horas, pelas flores masculinas; às 14 horas tem início o mecanismo de fechamento das flores femininas e, às 15 horas, o das flores masculinas.

FLOR MASCULINA						H O R A	FLOR FEMININA							
FECHADA Nº	PARCIALMENTE ABERTA Nº	TOTALMENTE ABERTA		POSIÇÃO DO ES TAME POR FLOR			RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA				TOTALMENTE ABERTA		PARCIALMENTE ABERTA Nº	FECHADA Nº
		Nº	%	ERGUIDO	DESCIDO		GRAU 0	GRAU 1	GRAU 2		Nº	%		
									Nº	%				
0	0	25	100,0	25	0	6	32	0	0	0,0	29	90,6	3	0
0	0	25	100,0	25	0	7	25	7	0	0,0	32	100,0	0	0
0	0	25	100,0	25	0	8	25	7	0	0,0	32	100,0	0	0
0	0	25	100,0	25	0	9	0	0	32	100,0	32	100,0	0	0
0	0	25	100,0	2	23	10	0	0	32	100,0	32	100,0	0	0
0	14	11	44,0	0	25	11	8	4	20	62,5	20	60,2	12	0
8	17	0	0,0	0	17	12	14	2	16	50,0	20	60,2	12	0
9	6	0	0,0	0	6	13	27	0	3	9,3	8	25,0	22	2
25	0	0	0,0	-	-	14	27	0	0	0,0	0	0,0	27	5
25	0	0	0,0	-	-	15	14	0	0	0,0	0	0,0	14	18
25	0	0	0,0	-	-	16	1	0	0	0,0	0	0,0	1	31
25	0	0	0,0	-	-	17	-	-	-	-	0	0,0	0	32

TABELA 1 - *M. tripartita* - Número de flores masculinas e femininas e os seus respectivos horários de antese, posição dos estames e o grau de receptividade do estigma em cada horário considerado. Dados obtidos em Campinas (SP) em 1982.

FLOR MASCULINA						H O R A	FLOR FEMININA							
FECHADA Nº	PARCIALMENTE ABERTA Nº	TOTALMENTE ABERTA		POSIÇÃO DO ES TAME POR FLOR			RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA				TOTALMENTE ABERTA		PARCIALMENTE ABERTA Nº	FECHADA Nº
		Nº	%	ERGUIDO	DESCIDO		GRAU 0	GRAU 1	GRAU 2		Nº	%		
									Nº	%				
6	0	0	0,0	-	-	6	6	0	0	0,0	0	0,0	6	1
5	1	0	0,0	-	-	7	7	0	0	0,0	0	0,0	7	0
1	5	0	0,0	0	5	8	7	0	0	0,0	1	14,3	6	0
0	5	1	16,6	0	6	9	6	1	0	0,0	1	14,3	6	0
0	3	3	50,0	2	4	10	4	1	2	28,5	7	100,0	0	0
0	2	4	66,6	6	0	11	3	2	2	28,5	7	100,0	0	0
0	0	6	100,0	6	0	12	0	2	5	71,4	7	100,0	0	0
0	0	6	100,0	6	0	13	0	2	5	71,4	7	100,0	0	0
0	0	6	100,0	4	2	14	4	3	0	0,0	5	71,4	2	0
0	1	5	83,3	0	6	15	6	0	0	0,0	5	71,4	1	1
0	4	2	33,3	0	6	16	6	0	0	0,0	0	0,0	6	1
1	5	0	0,0	0	5	17	2	0	0	0,0	0	0,0	2	4

TABELA 2 - *M. pilosa* - Número de flores masculinas e femininas e seus respectivos horários de antese, posição dos estames e grau de receptividade do estigma em cada horário. Dados obtidos em Campinas (SP) em 1982.

FLOR MASCULINA						H O R A	FLOR FEMININA							
FECHADA Nº	PARCIALMENTE ABERTA Nº	TOTALMENTE ABERTA		POSIÇÃO DO ESTAME POR FLOR			RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA				TOTALMENTE ABERTA		PARCIALMENTE ABERTA Nº	FECHADA Nº
		Nº	%	ERGUIDO	DESCIDO		GRAU 0	GRAU 1	GRAU 2		Nº	%		
									Nº	%				
11	0	0	0,0	-	-	6	-	-	-	-	0	0,0	0	9
11	0	0	0,0	-	-	7	-	-	-	-	0	0,0	0	9
11	0	0	0,0	-	-	8	-	-	-	-	0	0,0	0	9
11	0	0	0,0	-	-	9	-	-	-	-	0	0,0	0	9
11	0	0	0,0	-	-	10	-	-	-	-	0	0,0	0	9
11	0	0	0,0	0	11	11	3	0	0	0,0	0	0,0	3	6
0	8	3	27,2	11	0	12	6	2	0	0,0	2	22,2	6	1
0	4	7	63,6	11	0	13	0	1	8	88,8	8	88,8	1	0
0	0	11	100,0	11	0	14	0	0	9	100,0	9	100,0	0	0
1	0	10	90,9	9	0	15	2	0	7	77,7	9	100,0	0	0
5	0	6	54,5	4	0	16	0	2	5	55,5	7	77,7	0	2
9	0	2	18,1	0	0	17	4	0	0	0,0	0	0,0	4	5

TABELA 3 - *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' - Número de flores masculinas e femininas e os seus respectivos horários de antese, posição dos estames e grau de receptividade do estigma em cada horário considerado. Dados obtidos em Campinas (SP) em 1982.

FLOR MASCULINA						H O R A	FLOR FEMININA							
FECHADA Nº	PARCIALMENTE ABERTA Nº	TOTALMENTE ABERTA		POSIÇÃO DO ESTAME POR FLOR			RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA				TOTALMENTE ABERTA		PARCIALMENTE ABERTA Nº	FECHADA Nº
		Nº	%	ERGUIDO	DESCIDO		GRAU 0	GRAU 1	GRAU 2		Nº	%		
									Nº	%				
25	0	0	0,0	-	-	6	-	-	-	-	0	0,0	0	25
25	0	0	0,0	-	-	7	-	-	-	-	0	0,0	0	25
25	0	0	0,0	-	-	8	-	-	-	-	0	0,0	0	25
25	0	0	0,0	-	-	9	-	-	-	-	0	0,0	0	25
25	0	0	0,0	-	-	10	-	-	-	-	0	0,0	1	24
5	20	0	0,0	0	20	11	8	0	0	0,0	0	0,0	8	17
0	19	6	24,0	6	19	12	21	0	0	0,0	3	12,0	18	4
0	8	17	68,0	25	0	13	0	2	23	92,0	20	80,0	5	0
0	0	25	100,0	25	0	14	0	0	25	100,0	25	100,0	0	0
0	0	25	100,0	25	0	15	4	4	21	84,0	21	92,0	2	0
2	0	23	92,0	23	0	16	12	12	2	8,0	2	24,9	8	11
21	0	4	16,0	0	0	17	0	0	0	0,0	0	0,0	5	20

TABELA 4 - *M. esculenta* 'Taquari' - Número de flores masculinas e femininas e os seus respectivos horários de antese, posição dos estames e grau de receptividade do estigma em cada horário considerado. Dados obtidos em Campinas (SP) em 1982.

Pelas Tabelas 3 e 4 podemos observar que para o *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' e 'Taquari', respectivamente, o comportamento de ambos os cultivares é semelhante, iniciando-se a antese às 12 horas e começando a encerrar esse processo às 15 horas, exceto para as flores masculinas do 'Taquari', que iniciam o fechamento às 16 horas.

Pelo apresentado até o momento, cabe enfatizar que *M. tripartita* é, dentre as estudadas no presente trabalho, a única que possui flor feminina fechando depois das flores masculinas (Tabela 1).

Com base nas Tabelas 1, 2, 3 e 3, construímos as Figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente para as espécies *M. pilosa*, *M. tripartita* e *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' e 'Taquari'. Tais figuras demonstram o melhor horário para se efetuar a polinização, já que tornam mais visíveis os horários em que as flores masculinas e femininas estão totalmente abertas e a porcentagem da receptividade ótima do estigma (grau 2).

O ótimo para a polinização na espécie *M. pilosa* (Figura 1) encontra-se no patamar entre 12 e 13 horas, em que 100% das flores masculinas e femininas encontram-se abertas e 71,4% das flores femininas têm receptividade máxima do estigma.

Pela Figura 2, verificamos que *M. tripartita* tem entre 9 e 10 horas o seu melhor horário para a polinização, em que 100% das flores masculinas e 100% das flores femininas estão abertas e 100% dos estigmas tem uma receptividade de grau 2.

Se para ambas as espécies acima citadas, houve um patamar em que as flores se mantiveram ideais para a polinização, segundo as Figuras 1 e 2, através das Figuras 3 e 4, nota-se que para os cultivares de *M. esculenta* houve um período mais curto, ao redor das 14 horas, em que 100% das flores masculinas e femininas se encontravam abertas e 100% dos estigmas estavam em receptividade máxima.

Observando as quatro figuras em questão, nota-se

que para as espécies selvagens (Figuras 1 e 2), o fechamento se dá de forma relativamente gradual, revelado pela presença de um patamar nessas figuras (12 - 13 horas para a Figura 1 e 14-15 horas para a Figura 2), ao passo que para os cultivares (Figuras 3 e 4), esse evento se dá de forma mais brusca, e neles não se observa a presença de patamares mas, sim, de picos.

Nas flores parcialmente abertas, das cinco tépalas, normalmente há duas ou três que se abrem e as outras permanecem fechadas. A cor do estigma, branco brilhante antes da polinização, torna-se opaca e amarronzada depois da polinização. Caso não haja polinização, o estigma adquire a mesma cor marrom.

A quantidade de espécies de insetos que visitam as flores não foram registradas, por não visarmos os estudos de Biologia Floral.

LEGENDA

- FLOR MASCULINA
 ————— FLOR FEMININA
 + + + + + RECEPTIVIDADE DO ESTÍGMA

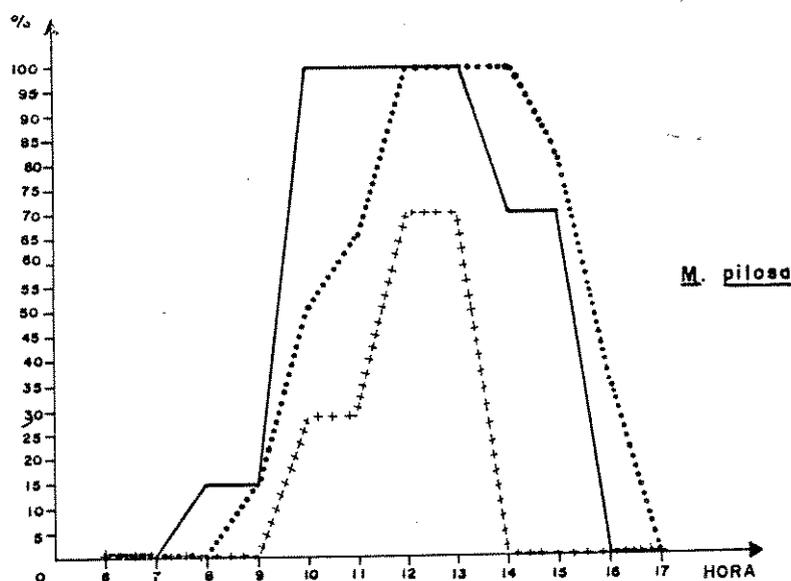


FIGURA 1 - *M. pilosa* - Porcentagem de flores masculinas e femininas totalmente abertas e porcentagem de receptividade ótima do estigma (grau 2) para cada hora de observação. Dados obtidos em Campinas (SP) em 1982.

FIGURA 2 - *M. tripartita* - porcentagem de flores masculinas e femininas totalmente abertas e porcentagem de receptividade ótima do estigma (grau 2) para cada horário de observação. Dados obtidos em Campinas (SP) em 1982.

FIGURA 3 - *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' - Porcentagem de flores masculinas e femininas totalmente abertas e porcentagem de receptividade ótima do estigma (grau 2) para cada horário de observação. Dados obtidos em Campinas (SP) em 1982.

FIGURA 4 - *M. esculenta* 'Taquari' - Porcentagem de flores masculinas e femininas totalmente abertas e porcentagem de receptividade ótima do estigma (grau 2) para cada horário de observação. Dados obtidos em Campinas (SP) em 1982.

LEGENDA

- FLOR MASCULINA
- FLOR FEMININA
- ++++++ RECEPTIVIDADE DO ESTÍMMA

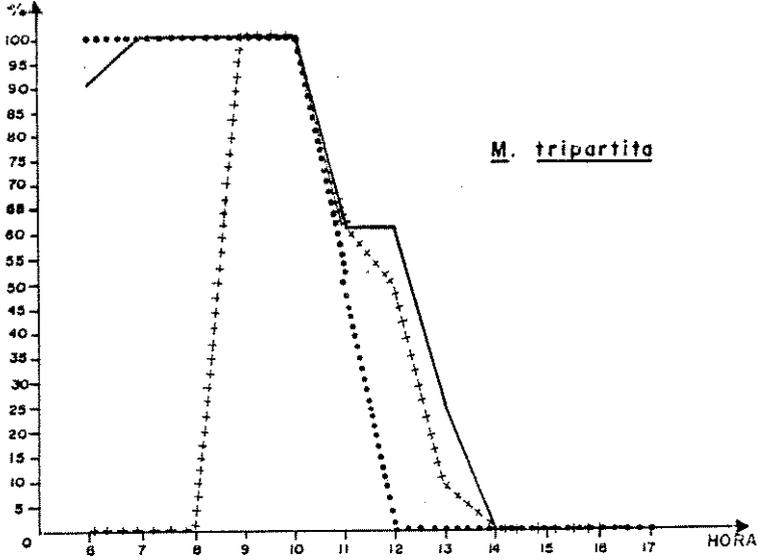


FIGURA 2

FIGURA 3

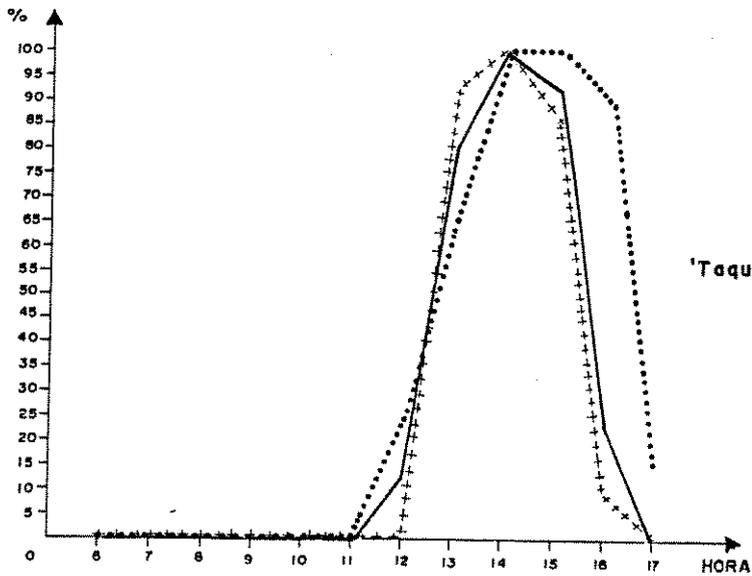
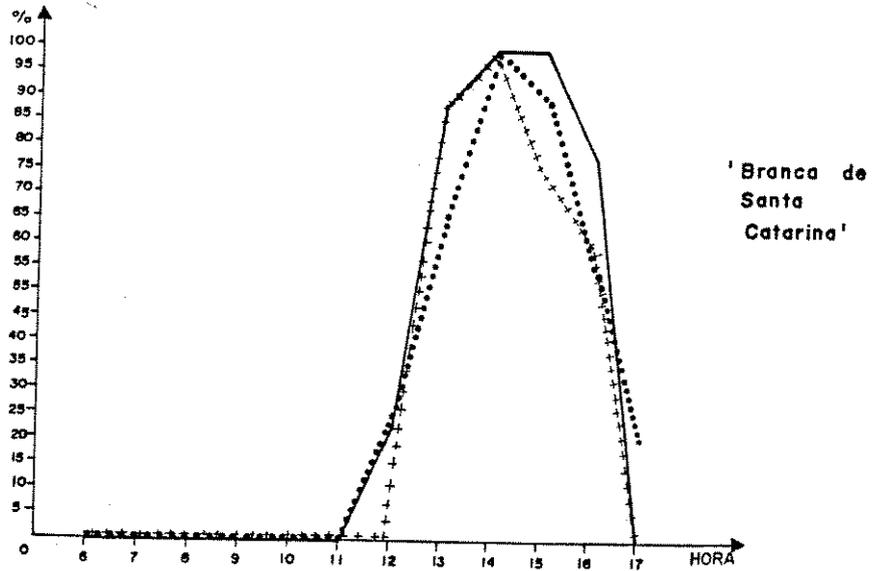


FIGURA 4

4.1.2. Número de Flores Masculinas e Femininas por Inflorescência

Com base na contagem dos botões masculinos e femininos em cada cem inflorescências das duas espécies selvagens e dos dois cultivares de *M. esculenta*, observamos que as proporções médias de flor masculina para cada flor feminina são relativamente próximas (Tabela 5), embora as menores proporções pertençam à espécie *M. tripartita* (10,29) e à *M. pilosa* (10,32).

A média de flores masculinas por inflorescência e a média de flores femininas por inflorescência, é praticamente a mesma para *M. tripartita* (60,00 flores masculinas/inflorescência; 5,38 flores femininas/inflorescência) e 'Taquari' (61,00 flores masculinas/inflorescência; 5,83 flores femininas/inflorescência).

O 'Branca de Santa Catarina' possui a maior média de flores masculinas e femininas, por inflorescência: cerca de 83,35 e 6,97, respectivamente.

ESPÉCIE ou CULTIVAR	MÉDIA DE FLOR MASCULINA POR INFLORESCÊNCIA e ERRO PADRÃO DA MÉDIA		MÉDIA DE FLOR FEMININA POR INFLORESCÊNCIA e ERRO PADRÃO DA MÉDIA		MÉDIA DE FLOR MASCULINA POR FLOR FEMININA	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)	
	FLOR MASC.	FLOR FEM.	FLOR MASC.	FLOR FEM.			
<i>M. tripartita</i>	60,00 ± 2,54	5,38 ± 0,14	10,29	42,4	25,6		
<i>M. pilosa</i>	65,30 ± 7,47	6,33 ± 0,88	10,32	68,6	84,2		
<i>M. esculenta</i> 'Branca de Sta.Catarina'	83,35 ± 57,85	6,97 ± 0,17	12,00	57,8	27,7		
<i>M. esculenta</i> 'Taquari'	61,00 ± 2,20	5,83 ± 0,27	10,40	36,1	47,9		

TABELA 5 - Média de flores masculinas e femininas por inflorescência e média de flores masculinas por flor feminina, e os respectivos erro-padrão da média e coeficiente de variação (%) para duas espécies selvagens e dois cultivares de *M. esculenta*.

4.1.3. Ciclos de Florescimento

A Tabela 6 fornece o número de inflorescências por planta entre os meses de outubro e junho, durante três ciclos de florescimento acompanhados: 1980/81; 1981/82; 1982/83. Por esses dados, verificamos que o florescimento de *M. tripartita* se inicia entre novembro e dezembro, e termina por volta de abril-maio. A espécie *M. pilosa* tem o início do florescimento entre outubro-novembro, e o final entre abril-maio. Desse modo, o período de floração destas duas espécies é praticamente coincidente.

Os cultivares de *M. esculenta* têm entre si um período de florescimento também semelhante: na Tabela 6, observamos que o 'Branca de Santa Catarina' começa a florescer entre dezembro e janeiro, e termina entre maio e junho. O 'Taquari', por sua vez, inicia o florescimento em janeiro e finda entre maio e junho.

Em relação aos cultivares, deve ser mencionado que no 3º ciclo de florescimento (1981/82), não se efetuaram observações, durante o mês de junho, devido às chuvas intensas que caíram na região de Campinas (SP) durante a primeira metade do mês, impossibilitando a ida ao campo.

Apesar de estarmos cientes de ser uma visão relativamente grosseira, não condizendo, portanto, com uma realidade mais apurada dos eventos sobre clima, apresentamos a Tabela 7, que indica o volume de chuvas (em mm) e temperaturas médias (em °C) durante cada ciclo de florescimento. Tais medidas foram calculadas a partir dos dados de chuva mensal (em mm) e a média mensal de temperatura (em °C) em cada ciclo. Os dados para a elaboração dessa tabela foram fornecidos pela Seção de Climatologia do Instituto Agrônomo de Campinas (SP).

Com a Tabela 6, elaboramos as Figuras 5, 6, 7 e 8, que indicam os três ciclos de florescimento para as espécies e

cultivares de *M. esculenta* considerados neste trabalho.

Através das Figuras 5, 6 e 8, pode-se observar que as espécies *M. pilosa*, *M. tripartita* e 'Taquari', respectivamente, tiveram o florescimento mais intenso no 3º ciclo (1982/83), o que coincide com o ciclo em que houve o maior volume de chuva (2131,74 mm, Tabela 7) e a maior temperatura média (22,30°C, Tabela 7). O 'Branca de Santa Catarina' teve um comportamento exatamente antagônico, como se verifica na Figura 7: o 3º ciclo de florescimento foi o de menor intensidade. O período em que o florescimento foi melhor, correspondeu ao 2º ciclo (1981/82), cujo período corresponde ao de menor temperatura média (20,9°C) e a um volume intermediário de chuva (1445,67 mm), como apresentado na Tabela 7.

O florescimento teve uma queda em um outro ciclo (Figuras 5, 6, 7 e 8), antes de atingir o pico. As espécies *M. tripartita* e *M. pilosa*, assim como o 'Taquari', tiveram apenas uma queda no florescimento, antes de atingirem o ponto máximo. Tanto para *M. pilosa* quanto para o 'Taquari', esse decréscimo no florescimento ocorreu no 2º ciclo, sendo que para a espécie selvagem, tal decréscimo foi entre os meses de novembro e dezembro, e para o cultivar de *M. esculenta*, entre os meses de janeiro e fevereiro. A queda no florescimento de *M. tripartita* ocorreu durante o 1º ciclo, mais precisamente, entre os meses de janeiro e fevereiro. Apenas o 'Branca de Santa Catarina' teve dois pontos decrescentes no florescimento, antes de atingir o pico. Tais pontos, como pode ser visto na Figura 7, ocorreram ambos nos meses de janeiro/fevereiro, sendo um no 1º ciclo e outro no 2º ciclo.

Pelas figuras apresentadas, pode-se observar que, de um ciclo para outro, existiu, nas espécies selvagens ou nos cultivares, uma pequena variação quanto ao mês em que o pico do florescimento foi atingido.

Com base na Tabela 6, montamos a Tabela 8, a qual apresenta a média de inflorescência em cada mês (de outubro a junho), em três ciclos de florescimento das espécies e dos cultivares utilizados neste estudo.

MÊS ESPÉCIE OU CULTIVAR	MÉDIA DE INFLORESCÊNCIA POR PLANTA									
	OUT.	NOV.	DEZ.	JAN.	FEV.	MAR.	ABR.	MAI.	JUN.	CICLO DE FLORESCIMENTO
<i>M. tripartita</i>	0,00	5,00	10,00	21,50	19,50	25,25	5,50	0,00	0,00	1980/81
	0,00	0,00	3,00	8,50	-	-	-	-	-	1981/82
	0,00	7,00	13,25	33,00	35,50	22,00	10,00	3,25	0,00	1982/83
<i>M. pilosa</i>	1,50	15,50	16,00	19,25	10,25	9,75	0,00	0,00	0,00	1980/81
	1,00	18,25	16,25	26,50	14,50	10,00	2,00	0,00	0,00	1981/82
	0,00	11,00	17,00	32,00	14,00	11,75	3,00	0,00	0,00	1982/83
'Branca de Santa Catarina'	0,00	0,00	0,00	6,17	5,50	17,37	7,42	3,75	1,00	1980/81
	0,00	0,00	4,92	7,75	9,07	27,75	9,40	6,37	0,00	1981/82
	0,00	0,00	0,00	7,00	5,00	9,25	8,27	6,12	-	1982/83
'Taquari'	0,00	0,00	0,00	5,22	17,45	15,20	8,00	5,00	0,00	1980/81
	0,00	0,00	0,00	12,00	10,00	16,40	13,77	9,50	2,00	1981/82
	0,00	0,00	0,00	10,00	32,50	35,00	26,00	20,20	-	1982/83

TABELA 6 - Média de inflorescência por planta em duas espécies selvagens e em dois cultivares de *M. acuminata*. A média de inflorescência em cada mês de florescimento foi acompanhada na cidade de Campinas (SP), durante três ciclos de florescimento (1980/81; 1981/82; 1982/83). O traço (-) indica ausência de observação.

MÉDIA POR CICLO	CICLO DE FLORESCIMENTO (ANO)		
	1980/81	1981/82	1982/83
VOLUME DE CHUVA (mm)	992,34	1445,67	2131,74
TEMPERATURA MÉDIA (°C)	21,50	20,90	22,30

TABELA 7 - Volume de Chuva (mm) e Temperatura Média (°C) durante os meses em que houve florescimento nos três ciclos acompanhados. As médias foram obtidas a partir dos dados mensais de volume de chuvas e temperaturas na cidade de Campinas (SP) fornecidos pela Seção de Climatologia do IAC.

ESPÉCIE OU CULTIVAR	MÊS	MÉDIA DE INFLORESCÊNCIA EM TRÊS CICLOS DE FLORESCIMENTO								
		OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN
<i>M. tripartita</i>		0,00	4,00	8,75	21,00	27,50	23,62	7,5	1,62	0,00
<i>M. pilosa</i>		0,83	14,91	16,41	25,91	12,91	10,50	1,66	0,00	0,00
'Branca de Sta. Catarina'		0,00	0,00	1,64	6,97	6,42	18,12	8,36	5,41	0,50
'Taquari'		0,00	0,00	0,00	9,07	19,98	22,20	15,92	1,56	1,00

TABELA 8 - Média de inflorescência em cada mês, durante três ciclos de florescimento estudados (1980/81; 1981/82; 1982/83) em duas espécies selvagens e em dois cultivares de *Manihot*.

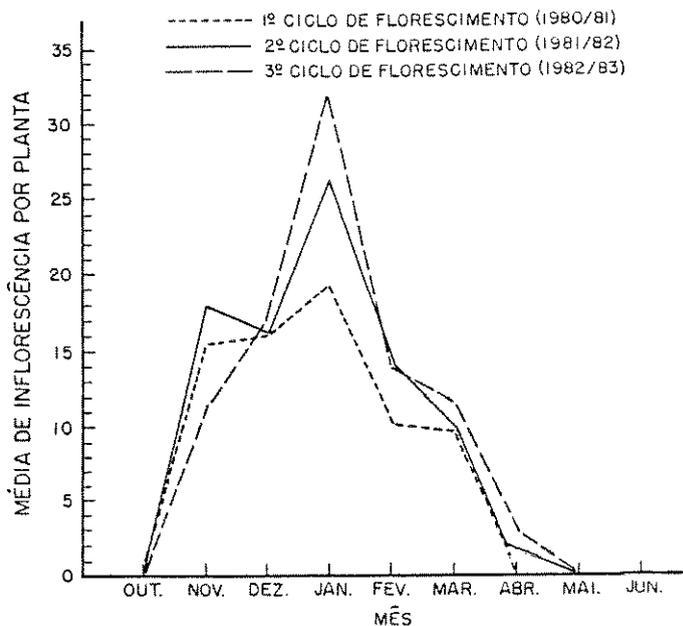


FIGURA 5 - *M. pilosa* - Média de inflorescência por planta nos meses correspondentes a 3 ciclos de florescimento (1980/81; 1981/82; 1982/83). Dados obtidos em Campinas (SP).

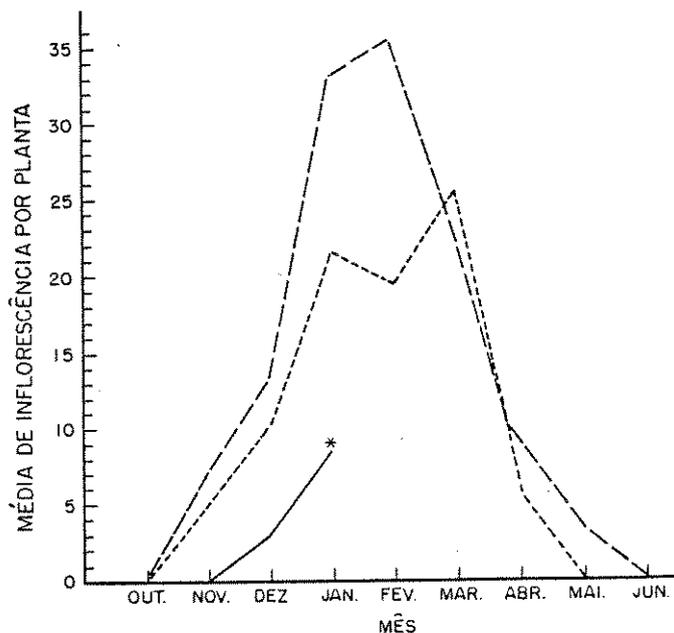


FIGURA 6 - *M. tripartita* - Média de inflorescência por planta nos meses correspondentes a 3 ciclos de florescimento (1980/81; 1981/82; 1982/83). Dados obtidos na cidade de Campinas (SP)

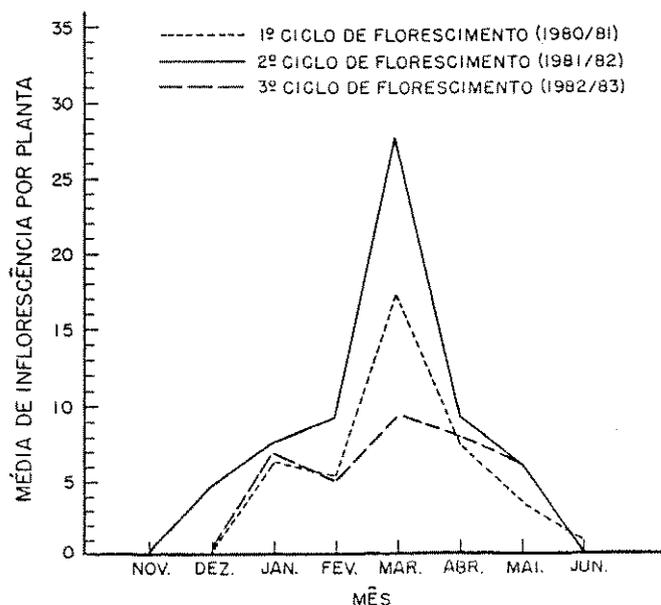


FIGURA 7 - *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' - Média de inflorescência por planta nos meses correspondentes a 3 ciclos de florescimento (1980/81; 1981/82; 1982/83). Dados obtidos na cidade de Campinas (SP).

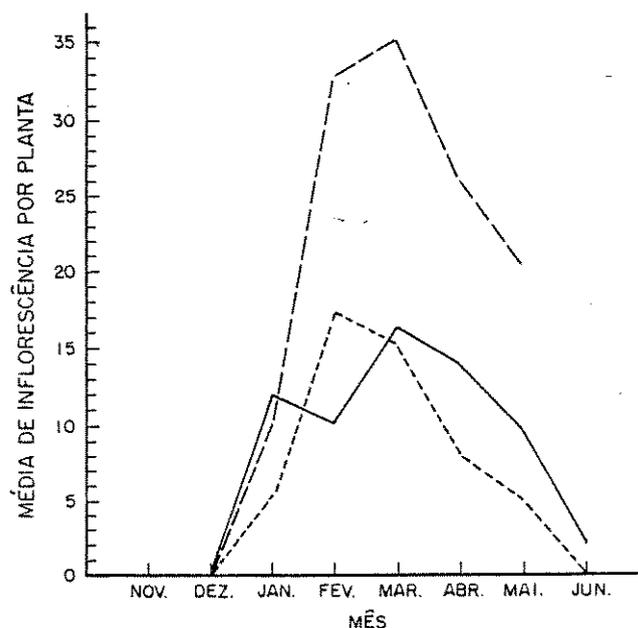


FIGURA 8 - *M. esculenta* 'Taquari' - Média de inflorescência por planta nos meses correspondentes a 3 ciclos de florescimento (1980/81; 1981/82; 1982/83). Dados obtidos na cidade de Campinas (SP).

Como foi visto na Tabela 6, apesar de existir uma ou outra variação no florescimento, é possível verificar, de forma mais ampla, pela Tabela 8, que nos três ciclos considerados, ambas as espécies, bem como o 'Branca de Santa Catarina', têm cerca de sete meses de florescimento, ao passo que o 'Taquari' tem cerca de seis meses de florescimento. O florescimento mais precoce é o da espécie *M. pilosa*: inicia-se em outubro, seguido pelo início do florescimento de *M. tripartita*, em novembro. Os cultivares iniciam o florescimento mais tardiamente: dezembro e janeiro, para o 'Branca de Santa Catarina' e o 'Taquari', respectivamente. Assim como é a mais precoce a florescer, a espécie *M. pilosa* é também a primeira a findar o florescimento, o que ocorre no mês de abril, seguida, em maio, pela espécie *M. tripartita* e, em julho, pelos cultivares. Verifica-se, desta forma, que a seqüência para iniciar o florescimento, é a mesma para findar.

Utilizando os dados da Tabela 8, foi possível construir a Figura 9, que mostra a tendência do florescimento nos três ciclos acompanhados para as espécies e cultivares. Pela Figura 9, observa-se que o pico de florescimento atingido pelas espécies, é distinto, ou seja, a espécie *M. pilosa* o atinge em janeiro, enquanto a espécie *M. tripartita* o atinge em fevereiro. Ainda pela Figura 9, verifica-se que ambos os cultivares têm pico de florescimento no mês de março.

Comparando-se o florescimento das espécies com o dos cultivares, conforme a Figura 9, pode ser observado que os maiores picos de florescimento são atingidos pelas espécies; entre os cultivares de *M. esculenta*, o maior pico atingido foi no 'Taquari'.

Um fato que devemos mencionar, diz respeito ao padrão de florescimento da espécie *M. tripartita*, que é bem distinto da espécie *M. pilosa* e dos cultivares de *M. esculenta*. Para *M. tripartita*, o florescimento ocorre aos saltos, isto é, há um período de aproximadamente 10-15 dias sem florescimento, e só então há um novo período de florescimento. Entretanto, em *M. pilosa* e *M. esculenta*, uma vez iniciado o florescimento, este se faz contínuo, por todo o período. O comportamento da es-

pêcie *M. tripartita* referente ao florescimento na Figura 9 não é visível, porque a variação mensal não aparece, por ser muito rápida.

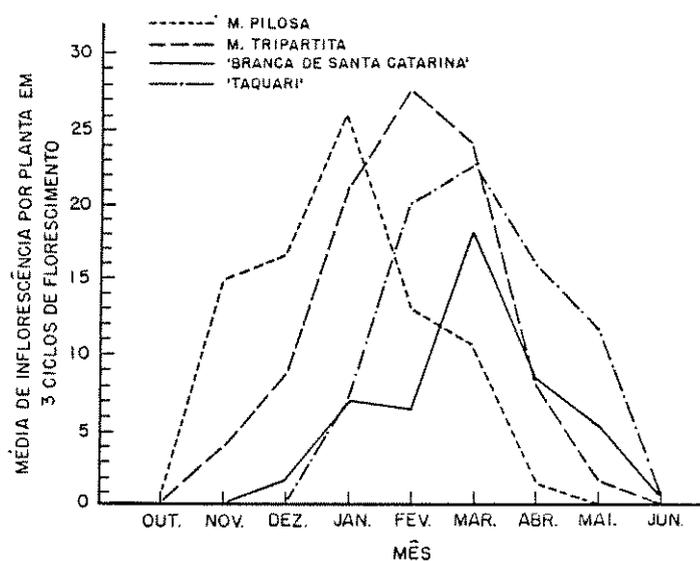


FIGURA 9 - Tendência do florescimento nas duas espécies selvagens e nos dois cultivares de *Manihot* nos três ciclos de florescimento acompanhados indistintamente. Dados obtidos na cidade de Campinas (SP).

4.2. Polinizações Experimentais

A Tabela 9 nos fornece o número de flores utilizadas, número e taxa de ovários desenvolvidos, frutos formados e sementes em início de formação e totalmente formadas, para as duas espécies selvagens e para a espécie cultivada de *Manihot*, durante três ciclos indistintos de florescimento, correspondentes aos anos de 1980/1981, 1982/83 e 1983/84. Pelos dados dessa tabela, podemos notar que, como resultado da maioria das polinizações feitas, ou há desenvolvimento até o fruto, ou o ovário seca alguns dias depois, exceto no caso dos cruzamentos entre *M. pilosa* x *M. pilosa* (2,2%); 'Branca de Santa Catarina' x *M. pilosa* (3,0%). Esses ovários permaneceram no mesmo estágio de desenvolvimento por aproximadamente 30 dias; depois disso, secaram e caíram.

Ainda pela Tabela 9, verificamos que é freqüente a ocorrência de sementes que iniciam o desenvolvimento, mas não o completam. Observa-se, também, que, em termos de formação de frutos, as maiores taxas foram para *M. pilosa* x *M. tripartita* (49,7%); *M. tripartita* x 'Taquari' (32,7%); 'Taquari' x 'Taquari' (31,7%) e 'Branca de Santa Catarina' x *M. pilosa* (30,3%).

Em termos de produção de sementes, podemos verificar, pela Tabela 9, que as espécies de *M. pilosa* e *M. esculenta* são as melhores produtoras de sementes, quando estas são empregadas como parentais femininos.

Utilizando os dados da Tabela 9, foi possível construir um diagrama, mostrando a tendência dos cruzamentos, em termos de produção de sementes, como apresentamos a seguir:

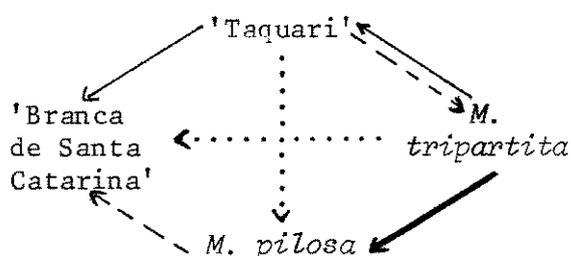


DIAGRAMA DE CRUZAMENTO: TENDÊNCIA DE FORMAÇÃO DE SEMENTES

Observação: As setas vão no sentido do parental masculino para o parental feminino.

> 25% —————
 10% - 25% —————
 5% - 10% - - - - -
 0% - 5%

Quer nas espécies selvagens, quer na espécie cultivada, os frutos levam cerca de 60 a 90 dias para o amadurecimento e ulterior deiscência. Isso não exclui casos em que foram observados frutos que levaram até cerca de 100 dias para amadurecer, no 'Taquari'. Também é freqüente encontrar-se frutos com dois lóculos. Embora não tenha sido quantificado o fenômeno, esse evento parece ser mais comum em *M. tripartita* e em *M. esculenta* 'Taquari'.

4.3. Teste para Agamospermia

Para as espécies *M. pilosa* e *M. tripartita*, as observações de campo, visando a detecção da agamospermia, foram feitas durante o florescimento dos anos 1980/81 e 1982/83. Para o 'Taquari', tais observações foram efetuadas nos florescimentos dos anos de 1980 e 1982 e, no 'Branca de Santa Catarina', o florescimento foi acompanhado nos anos de 1980 e 1983. Tais resultados são apresentados na Tabela 10. Essa tabela fornece, em números absolutos e em porcentagem, o número das flores utilizadas em cada ano e o número de ovários desenvolvidos, frutos formados e sementes obtidas. O cálculo de porcentagem para as sementes produzidas, foi feito mediante a suposição teórica de que havia três lóculos em cada fruto e uma semente em cada lóculo.

O termo "ovário desenvolvido" se refere aqui à condição de fruto, secando e caindo algum tempo depois. Esse comportamento é distinto daquele em que o ovário não se desenvolve, pois cerca de três a cinco dias após a abertura da flor, ele seca e cai.

σ	<i>M. pilosa</i>	<i>M. tripartita</i>	'Taquari'	'Branca de Santa Catarina'		
<i>M. pilosa</i>	134	243	3	—	Nº DE FLORES	
	30 (22,3)	121 (49,7)	0 (0,0)	—	Nº E (%) DE FRUTOS	
	3 (2,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	—	Nº E (%) DE OVÁRIOS DESENVOLVIDOS	
	0 (0,0)	3 (5,0)	0 (0,0)	—	INÍCIO DE FORMAÇÃO	Nº E (%) DE SEMENTES
	66 (16,4)	324 (44,4)	0 (0,0)	—	TOTALMENTE FORMADAS	
<i>M. tripartita</i>	110	504	50	—	Nº DE FLORES	
	2 (1,8)	43 (8,5)	19 (32,7)	—	Nº E (%) DE FRUTOS	
	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	—	Nº E (%) DE OVÁRIOS DESENVOLVIDOS	
	0 (0,0)	12 (0,9)	0 (0,0)	—	INÍCIO DE FORMAÇÃO	Nº E (%) DE SEMENTES
	6 (1,8)*	77 (5,0)*	15 (10,0)*	—	TOTALMENTE FORMADAS	
'TAQUARI'	—	4	660	—	Nº DE FLORES	
	—	1 (25,0)	203 (31,7)	—	Nº E (%) DE FRUTOS	
	—	0 (0,0)	0 (0,0)	—	Nº E (%) DE OVÁRIOS DESENVOLVIDOS	
	—	0 (0,0)	0 (0,0)	—	INÍCIO DE FORMAÇÃO	Nº E (%) DE SEMENTES
	—	2 (16,6)	392 (19,7)	—	TOTALMENTE FORMADAS	
'BRANCA DE SANTA CATARINA'	33	7	752	—	Nº DE FLORES	
	10 (30,3)	2 (28,5)	196 (26,0)	—	Nº E (%) DE FRUTOS	
	1 (3,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	—	Nº E (%) DE OVÁRIOS DESENVOLVIDOS	
	10 (10,1)	3 (14,2)	61 (3,2)	—	INÍCIO DE FORMAÇÃO	Nº E (%) DE SEMENTES
	7 (7,0)	1 (4,7)	338 (14,9)	—	TOTALMENTE FORMADAS	

TABELA 9 - Polinizações feitas com as espécies selvagens e dois cultivares de *Manihot* e as respectivas taxas e números absolutos da obtenção de frutos, ovários desenvolvidos e sementes. As polinizações foram feitas em três ciclos de florescimento (1980/81; 1982/83; 1983/84) na cidade de Campinas (SP). (*) Sementes inviáveis.

		<i>M. tripartita</i>	<i>M. pilosa</i>	'Branca de Santa Catarina'	'Taquari'	Ciclo de Florescimento
Nº DE FLORES		—	—	508	396	
Nº E (%) DE FRUTOS		—	—	31 (6,0)	25 (6,0)	1
Nº E (%) DE OVÁRIOS DESENVOLVIDOS		—	—	21 (4,10)	107 (27,0)	9 8
Nº E (%) DE SEMENTES	INÍCIO DE FORMAÇÃO	—	—	39 (25,0)	49 (12,0)	0
	TOTALMENTE FORMADAS	—	—	2 (1,0)	6 (1,5)	
Nº DE FLORES		114	193	—	—	1
Nº E (%) DE FRUTOS		0 (0,0)	0 (0,0)	—	—	9 8
Nº E (%) DE OVÁRIOS DESENVOLVIDOS		11 (9,7)	0 (0,0)	—	—	0 /
Nº E (%) DE SEMENTES	INÍCIO DE FORMAÇÃO	22 (66,7)	0 (0,0)	—	—	1 9
	TOTALMENTE FORMADAS	0 (0,0)	0 (0,0)	—	—	8 1
Nº DE FLORES		—	—	—	387	
Nº E (%) DE FRUTOS		—	—	—	134 (34,7)	1
Nº E (%) DE OVÁRIOS DESENVOLVIDOS		—	—	—	41 (10,5)	9 8
Nº E (%) DE SEMENTES	INÍCIO DE FORMAÇÃO	—	—	—	3 (0,5)	2
	TOTALMENTE FORMADAS	—	—	—	0 (0,0)	
Nº DE FLORES		93	303	—	—	1
Nº E (%) DE FRUTOS		0 (0,0)	1 (0,2)	—	—	9 8
Nº E (%) DE OVÁRIOS DESENVOLVIDOS		0 (0,0)	73 (20,0)	—	—	2 /
Nº E (%) DE SEMENTES	INÍCIO DE FORMAÇÃO	0 (0,0)	221 (99,5)	—	—	1 9
	TOTALMENTE FORMADAS	0 (0,0)	3* (1,3)	—	—	8 3
Nº DE FLORES		—	—	260	—	1
Nº E (%) DE FRUTOS		—	—	38 (14,5)	—	9 8
Nº E (%) DE OVÁRIOS DESENVOLVIDOS		—	—	5 (2,7)	—	3 /
Nº E (%) DE SEMENTES	INÍCIO DE FORMAÇÃO	—	—	65 (47,0)	—	1 9
	TOTALMENTE FORMADAS	—	—	2 (1,5)	—	8 4

TABELA 10 - Teste para agamospermia para duas espécies selvagens e dois cultivares de *Manihot* e os respectivos ciclos de florescimento em que foram testadas.
(* Sementes inviáveis.

Quanto às espécies selvagens, ambas estudadas nos mesmos ciclos de florescimento, pode-se verificar, pela Tabela 10, que a espécie *M. pilosa*, na ausência de polinização, só frutificou no ciclo referente ao ano de 1982/83, havendo uma produção de três sementes. Tais sementes, contudo, só possuíam a casca, eram desprovidas de embrião. A espécie *M. tripartita*, por sua vez, não frutificou na ausência de polinização, em nenhum dos ciclos de florescimento acompanhados.

No tocante aos cultivares de *M. esculenta*, tanto para o 'Taquari' quanto para o 'Branca de Santa Catarina', a maior frequência de frutificação na ausência de polinização, conforme os dados da Tabela 10, ocorreu para o 'Taquari', no ano de 1982, e para o 'Branca de Santa Catarina', no ano de 1983. Tais frequências foram, respectivamente, 34,6% e 13,1%. Para os cultivares, a produção de sementes foi semelhante na ausência de polinização, para cada ano em que o florescimento foi acompanhado. Contudo, as sementes foram inviáveis.

A Tabela 11 apresenta os resultados, independentemente do ano em que foi feito o estudo, para a produção de frutos e sementes, bem como, a produção de ovários desenvolvidos e o número de flores utilizadas para as duas espécies e cultivares de *M. esculenta*.

ESPÉCIE OU CULTIVAR	Nº DE FLORES	Nº E (%) DE FRUTOS	Nº E (%) DE OVÁRIOS DESENVOLVIDOS	SEMENTES	
				INÍCIO DE FORMAÇÃO	TOTALMENTE FORMADAS
<i>M. tripartita</i>	207	0 (0,0)	11 (5,3)	22 (3,5)	0 (0,0)
<i>M. pilosa</i>	496	1 (0,2)	73 (14,7)	221 (14,8)	3* (0,2)
'Branca de Santa Catarina'	768	69 (8,9)	26 (3,3)	104 (4,5)	4 (0,1)
'Taquari'	783	159 (20,3)	148 (18,9)	52 (2,2)	6 (0,2)

TABELA 11 - Comportamento das espécies selvagens e de dois cultivares de *Manihot* quanto à agamospermia em ciclos indistintos de florescimento. Dados obtidos na cidade de Campinas (SP). (*) Sementes inviáveis.

Pela Tabela 11, observa-se que, na ausência de polinização, para os diversos anos em que foram estudados o florescimento, indistintamente, a espécie *M. tripartita* não frutificou, porém, teve 5,3% de ovários desenvolvidos e foi, entre as plantas estudadas, a que teve a maior frequência de sementes que apresentaram um início de desenvolvimento (66,7%). Entre as espécies e cultivares de *M. esculenta* utilizadas no presente estudo, a "Taquari" possui a maior frequência de frutificação (18,9%). Contudo, a taxa de sementes formadas totalmente, na ausência de polinização, é bastante pequena.

Com base nos resultados da Tabela 11, fizemos um teste de independência para verificar se o desenvolvimento de frutos e de ovários é um evento dependente dos cultivares e espécies consideradas, ou não. Pelo teste de independência, verificamos que, para 3 graus de liberdade, tanto a formação de frutos como o desenvolvimento de ovários, é dependente das espécies em questão, pois encontramos para a frutificação,

$$\chi^2 = 189,70 \quad (P \leq 0,01)$$

e, para o desenvolvimento de ovários,

$$\chi^2 = 102,60 \quad (P \leq 0,01).$$

4.4. Microsporogênese

Não conseguimos cortes de botões masculinos jovens o suficiente para que pudéssemos acompanhar o desenvolvimento das anteras, pelo fato de serem esses botões demasiado pequenos e, por isso, não ser possível obter cortes satisfatórios.

A Figura 10 representa o corte transversal de um botão masculino do 'Branca de Santa Catarina', e podemos observar cinco das dez anteras existentes. Essas anteras são as do verticilo superior, uma vez que esse corte representado na Figura 10 é inicial, pegando, portanto, as anteras superiores.

A Figura 11 mostra o detalhe de uma das anteras da figura anterior. Podemos observar aí, o quão jovem ainda é esse botão, pois os quatro microsporângios encontram-se separados

por um septo. Embora em três microsporângios possamos observar a presença de uma célula-mãe do micrôsporo em cada um deles, no microsporângio inferior esquerdo verificamos que a célula-mãe do micrôsporo já se dividiu. Isto sugere que a divisão dessa célula ocorre bem no início do desenvolvimento do botão e, também, que a divisão não é concomitante em todos os microsporângios.

Na Figura 12, temos o detalhe de um microsporângio da antera do 'Branca de Santa Catarina' da Figura 11 e, através desse detalhe, verificamos que o saco polínico é constituído por uma camada externa de células com uma forma próxima a retangular, formando a epiderme. A camada celular mediana corresponde ao endotécio, e a camada de células mais internas constitui o chamado tapete. Essas células do tapete estão em divisão, como pode ser observado; este é outro indicativo de que o botão que se está estudando é bastante jovem. Distinguindo-se das células do tapete, quer pela forma - tendendo a poliédrica, quer por ocupar a posição mais central do microsporângio, temos a célula-mãe do micrôsporo. Além dessas características citadas, essa célula difere das demais que a circundam, por apresentar um citoplasma denso, que delimita um núcleo ligeiramente deslocado do centro, núcleo esse de coloração muito fraca, contendo uma cromatina reticular, muito fina, quase imperceptível, de aspecto frouxo. Contrastando com essa característica, de coloração inconspícua do núcleo e do material nuclear, observamos, conforme indica a seta, a presença de um nucléolo muito desenvolvido, de coloração intensa, dando-lhe o aspecto de um corpúsculo denso, pesado.

Cada uma das células-mãe dos micrôsporos entra em divisão para, no final de duas divisões sucessivas, formar os quatro grãos de pólen de cada loja da antera. A meiose, nas plantas estudadas, foi de difícil acompanhamento, devido tanto à presença constante de gotículas incolores no citoplasma, que acreditamos ser amido, quanto ao tamanho reduzido dos cromossomos e, ainda, pela dificuldade em se obter um bom espalhamento dos cromossomos, principalmente nos estágios iniciais da primeira prófase. Todavia, foi possível verificar a regularidade do fenômeno, com a formação de 18 bivalentes em diacinese e na metáfase da primeira divisão.

Algumas particularidades da primeira divisão meiótica merecem ênfase: os primeiros estágios da divisão, isto é, de leptôteno a diacinese, parecem ser extremamente rápidos e de difícil visualização, tanto devido ao mau espalhamento dos cromossomos, quanto devido à coloração fraca dos mesmos. É bom ressaltar que, como este trabalho não visava exclusivamente a citologia, não nos detivemos no aprimoramento de técnicas para uma melhor observação desses estágios iniciais da meiose. O paquíteno é, talvez, entre as rápidas etapas da prófase I, a de duração mais prolongada, haja visto a grande quantidade de células encontradas nessa fase (Tabela 12). Durante a primeira prófase, o núcleo permanece com toda a notoriedade que se apresentava antes da célula-mãe do micrôsporo começar a se dividir. Apesar da regularidade constatada no comportamento meiótico, o 'Branca de Santa Catarina' foi peculiar, no tocante à existência de um assincronismo grande de estágios da meiose em um mesmo botão, o que, no outro cultivar e nas demais espécies selvagens estudadas, não ocorre. Além disso, parece haver, no 'Branca de Santa Catarina', uma "viscosidade" na cromatina, o que torna os cromossomos mais lentos na sua separação.

Também foi observado, principalmente em paquíteno e, mais raramente, em diacinese, porém nunca nas etapas subsequentes, a ocorrência de células duplas, apresentando citomixia, conforme pode ser observado na Figura 13. Foram as seguintes as frequências de células duplas em paquíteno: 'Branca de Santa Catarina' - 60,0%; 'Paquari' - 78,9%; *M. tripartita* - 3,38%; *M. pilosa* - não foram encontradas células duplas.

No 'Branca de Santa Catarina' foram observados vários corpúsculos esféricos dispersos pelo núcleo, cuja aparência se assemelha a micronúcleos; porém, não foram feitos testes citoquímicos para maiores considerações.

As Figuras 14, 15, 16 e 17 ilustram as melhores etapas conseguidas na primeira divisão meiótica das espécies e cultivares em estudo. Deve-se observar a coloração bastante fraca dos cromossomos no estágio de paquíteno e diacinese (Figuras 14 e 15, respectivamente) e a presença marcante do nucléolo (Figura 15). A Figura 16 indica a formação regular de 18 bi

valentes em metáfase. A Figura 17, referente à anáfase da primeira meiose, nos mostra que os cromossomos migram para os polos sem que tenham sido detectados cromossomos retardatários e pontes cromossômicas.

A segunda divisão meiótica se processa de maneira regular e mais rapidamente que a primeira divisão, conforme se observa pelos dados da Tabela 12. Os cromossomos na segunda divisão, se apresentam mais aglomerados do que na primeira divisão, o que torna mais difícil a sua observação individualizada.

A divisão da célula-mãe dos micrôsporos é do tipo simultâneo, conforme nos mostra a Figura 18. Por essa ilustração, podemos observar que o sulco de divisão se dá por uma região clara que se forma no citoplasma, enquanto uma maior condensação de citoplasma se acumula em torno de cada um dos quatro núcleos formados. O nucléolo, bastante corado, ressurge nessa etapa. As espécies *M. pilosa* e *M. tripartita* e 'Taquari' apresentam tétrades com quatro micrôsporos, com exceção do 'Branca de Santa Catarina', que apresentou 4,70% das tétrades com três micrôsporos.

A Tabela 12, a seguir, refere-se ao número de células observadas na meiose, nas respectivas etapas, tanto para os cultivares, quanto para as espécies selvagens de *Manihot*.

Etapas da Meiose	'Branca de Santa Catarina'	'Taquari'	<i>M. tripartita</i>	<i>M. pilosa</i>
Leptóteno	-	-	-	-
Zigóteno	-	-	-	-
Paquíteno	45	19	30	4
Diplóteno	-	-	-	-
Diacinese	8	7	-	-
Metáfase I	32	30	11	1
Anáfase I	13	3	-	-
Telófase I	-	-	32	-
Prófase II	-	-	-	-
Metáfase II	3	1	1	-
Anáfase II	-	3	12	-
Telófase II	24	-	-	-
Tétrade	43	93	106	14

TABELA 12 - Etapas da divisão meiótica e o número de células examinadas em cada etapa para dois cultivares e duas espécies selvagens de *Manihot*.



FIGURA 10 - *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' - Corte transversal no botão masculino onde se observam 5 das 10 anteras existentes. x 512

Uma vez finda a meiose das células-mãe dos micrósporos, obtivemos um botão com os micrósporos em cada loja. Uma vista geral de um botão masculino de *M. esculenta* "Branca de Santa Catarina" com os micrósporos, pode ser observada na Figura 19. Provavelmente devido ao maior tamanho do botão, o corte transversal passou pelas dez anteras, de forma que podem todas as anteras serem visualizadas nessa figura.

Um detalhe da antera madura com a tetrade de micrósporos do tipo tetraédrico é encontrado na Figura 20. Aqui, cabe enfatizar a ocorrência dos sinais de degeneração dos septos entre os microsporângios, de maneira que eles se tornam confluentes. Essa degeneração é observada pela presença intensa de coloração nas células. Nessa figura, também podemos observar que, enquanto em tetrade, os micrósporos são envolvidos por uma membrana hialina.

Pela Figura 21, verificamos, na espécie *M. tripartita*, que o arranjo tetraédrico dos micrósporos já deu vez à sua liberação, havendo, portanto, o desaparecimento da membrana hialina e o surgimento da membrana dos grãos de pólen. Estes são redondos, com um citoplasma bastante colorido e bastante vacuolado. Nota-se, também, a presença de um núcleo central de coloração intensa.

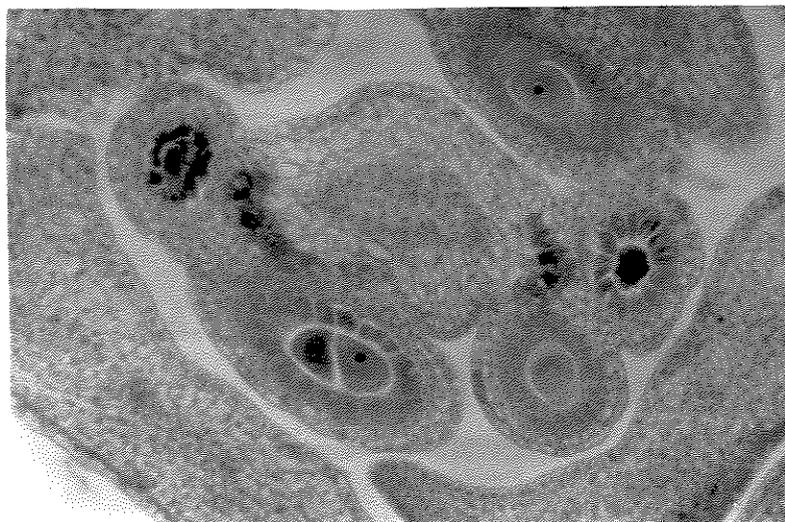


FIGURA 11 - *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina'. Detalhe de uma das anteras do botão da Figura 10. Os microsporângios estão separados por um septo. Observar no microsporângio inferior esquerdo a célula-mãe do microsporo já dividida. x 80

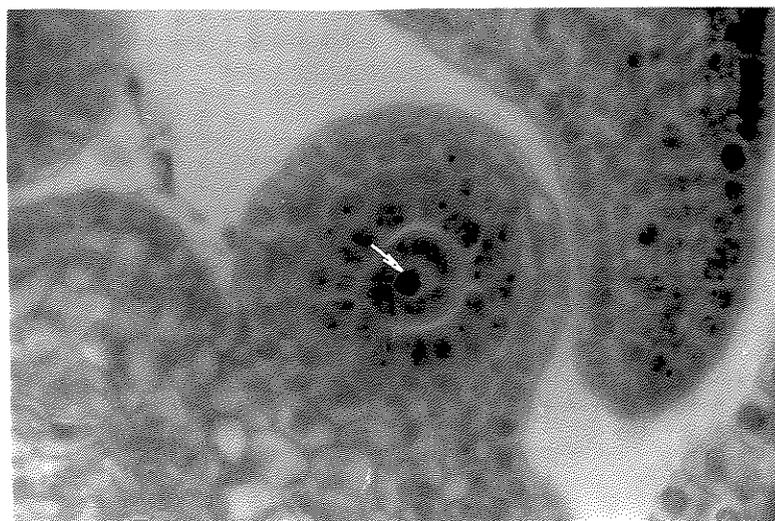


FIGURA 12 - *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina'. Detalhe de um microsporângio da Figura 11. Da parte externa para a interna observa-se: epiderme, endotécio, ta pete e célula-mãe do microsporo, caracterizada pelo núcleo de coloração fraca e cromatina reticular. A seta indica o nucléolo conspícuo. x 512

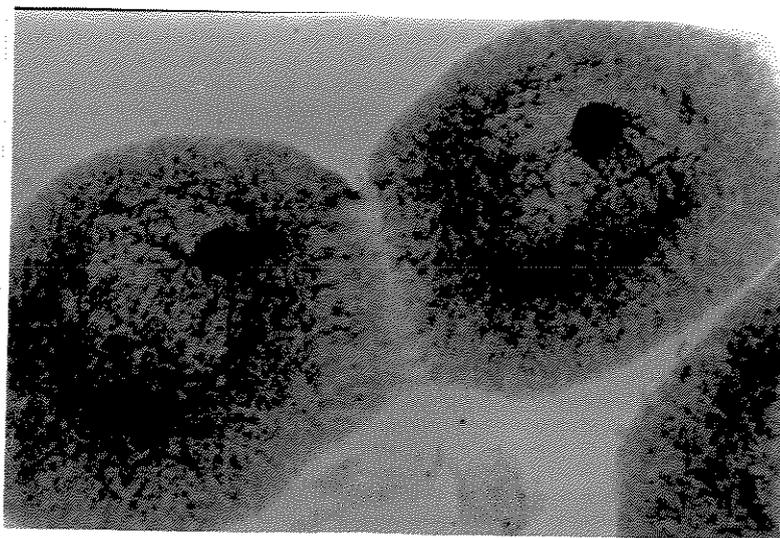


FIGURA 13 - *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina'. Célula dupla em paquíteno apresentando citomixia. x 512



FIGURA 14 - *M. tripartita* - Paquíteno. Atente-se para a coloração bastante fraca dos cromossomos. x 640

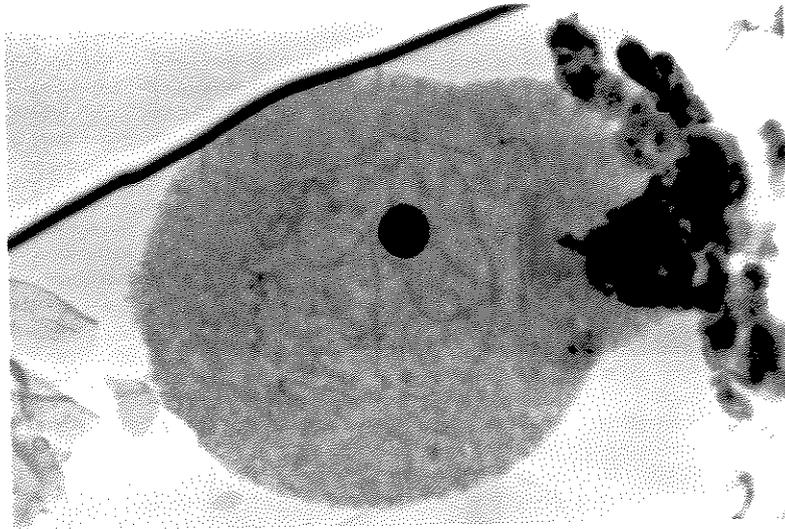


FIGURA 15 - *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' - Diacinese.
O nucléolo se mantém conspícuo ainda. x 640

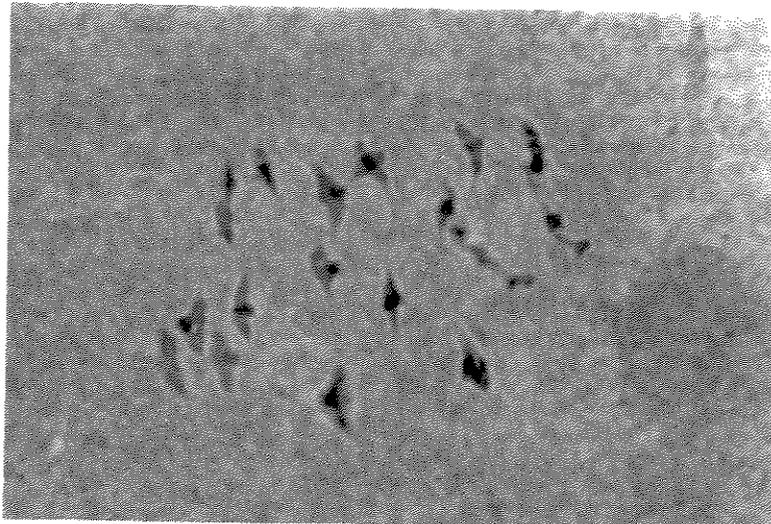


FIGURA 16 - *M. esculenta* 'Taquari' - Metáfase com 18 bivalentes.
x 1600

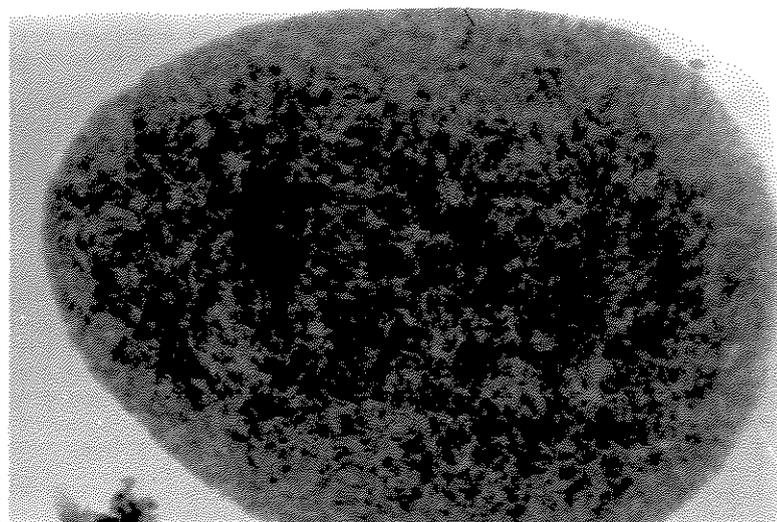


FIGURA 17 - *M. esculenta* 'Taquari' - Anáfase I mostrando a migração regular dos cromossomos para os polos. x 640

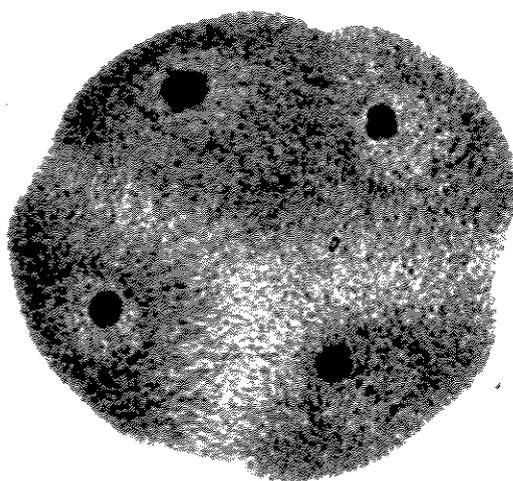


FIGURA 18 - *M. pilosa* - Tétrade de micrôsporos indicando a divisão do tipo simultâneo. x 640



FIGURA 19 - *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' - Botão masculino adulto, em corte transversal, onde os micrôsporos já estão formados (x 41).



FIGURA 20 - *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' - Antera madura, em corte transversal, onde se observa os 4 microsporângios com a tetrade de micrôsporos já formados e envolvidos por membrana hialina. Pode ser verificada a ocorrência de degeneração nas células parenquimáticas no septo entre os conectivos, caracterizada pela coloração escura nas células (x 63).

A Figura 22 apresenta um detalhe de um microsporângio da Figura 21 de *M. tripartita*. Aqui, os micrôsporos estão livres e as células do tapete bem degeneradas, havendo apenas resíduos destas. A camada mediana corresponde ao endotécio, e encontra-se espiralada. A camada externa, ou seja, a camada das células da epiderme, apresentam as suas células dispostas de maneira mais frouxa. Quanto à espiralização da camada mediana do endotécio, pode ser observada em maior detalhe na Figura 23. Nessa figura, referente à espécie *M. tripartita*, observamos o endotécio espiralado e a ausência de sinais referentes a células do tapete, que já se desfizeram. Isso pode ser contrastado com as Figuras 24 e 25, referentes ao 'Branca de Santa Catarina'. Na Figura 24, verificamos que o espessamento do endotécio não está espiralado e, na Figura 25, verificamos que as células do tapete estão incólumes e grandes, havendo até células em divisão, conforme indica a seta, na referida figura. A Figura 26 nos indica que em *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina', a célula do tapete continua incólume, conforme observado na Figura 25, quando os micrôsporos estão formados.



FIGURA 21 - *M. tripartita*. Grãos de pólen liberados. Observar a coloração intensa dos grãos. x 200



FIGURA 22

FIGURA 23

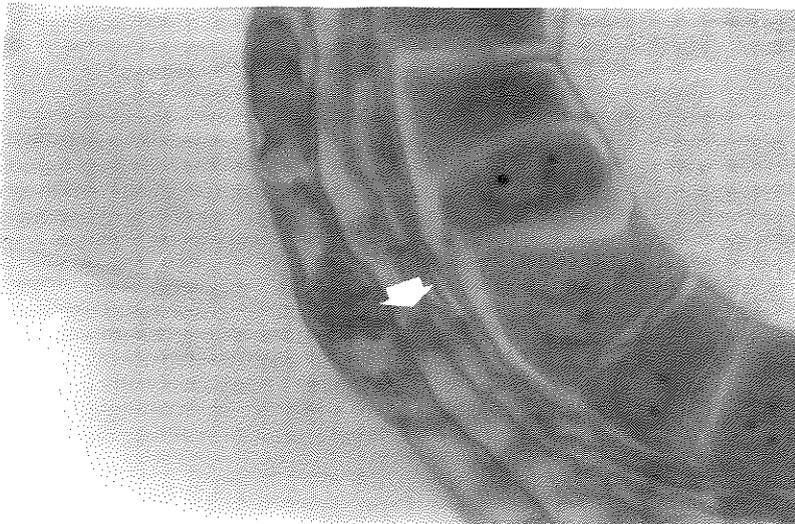


FIGURA 24

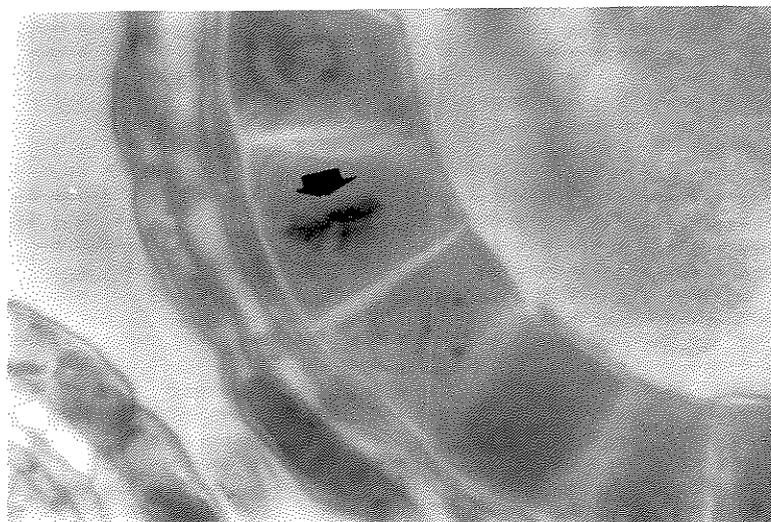


FIGURA 25 - *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' - Células do tapete em divisão, conforme indica a seta (x 512).



FIGURA 26 - *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' - Microsporos formados e a células do tapete permanecem incôlumes (seta). (x 512).

4.4.1. Estudo dos Grãos de Pólen

As espécies e cultivares de *Manihot* utilizadas neste estudo, tiveram a fertilidade dos grãos de pólen determinada pelo método da coloração pelo carmim acético 1,2% e, segundo a quantidade de grãos analisados e que receberam a coloração do carmim (grãos férteis), elaboramos a Tabela 13.

ESPÉCIE OU CULTIVAR	Nº DE GRÃOS ANALISADOS	TAXA DA VIABILIDADE (%)
<i>M. tripartita</i>	3.988	93,30
<i>M. pilosa</i>	6.651	67,30
'Taquari'	9.260	95,43
'Branca de Santa Catarina'	8.273	0,69

TABELA 13 - Número de grãos de pólen analisados para duas espécies e dois cultivares de *Manihot* e taxa de viabilidade masculina.

Pela Tabela 13, pode-se notar que a maior e a menor taxas de viabilidade são, respectivamente, do 'Taquari' e 'Branca de Santa Catarina'; a despeito disso, a produção de pólen foi sempre abundante em todos os cultivares e nas duas espécies selvagens. A taxa reduzida da viabilidade do pólen no 'Branca de Santa Catarina', deve-se à não degenerescência das células do tapete, como será discutido mais tarde.

Com a medida do diâmetro de cem grãos de pólen para cada espécie e cultivar, construímos as Figuras 27, 28, 29, e 30. Através dessas figuras, verifica-se que o maior tamanho médio de grãos foi encontrado em *M. esculenta* 'Taquari' (210,38 μ - Figura 30) e o menor tamanho médio em *M. pilosa* (151,77 μ -

N.º DE GRÃOS

32
31
30
29
28
27
26
25
24
23
22
21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0

FIGURA 27
M. tripartita

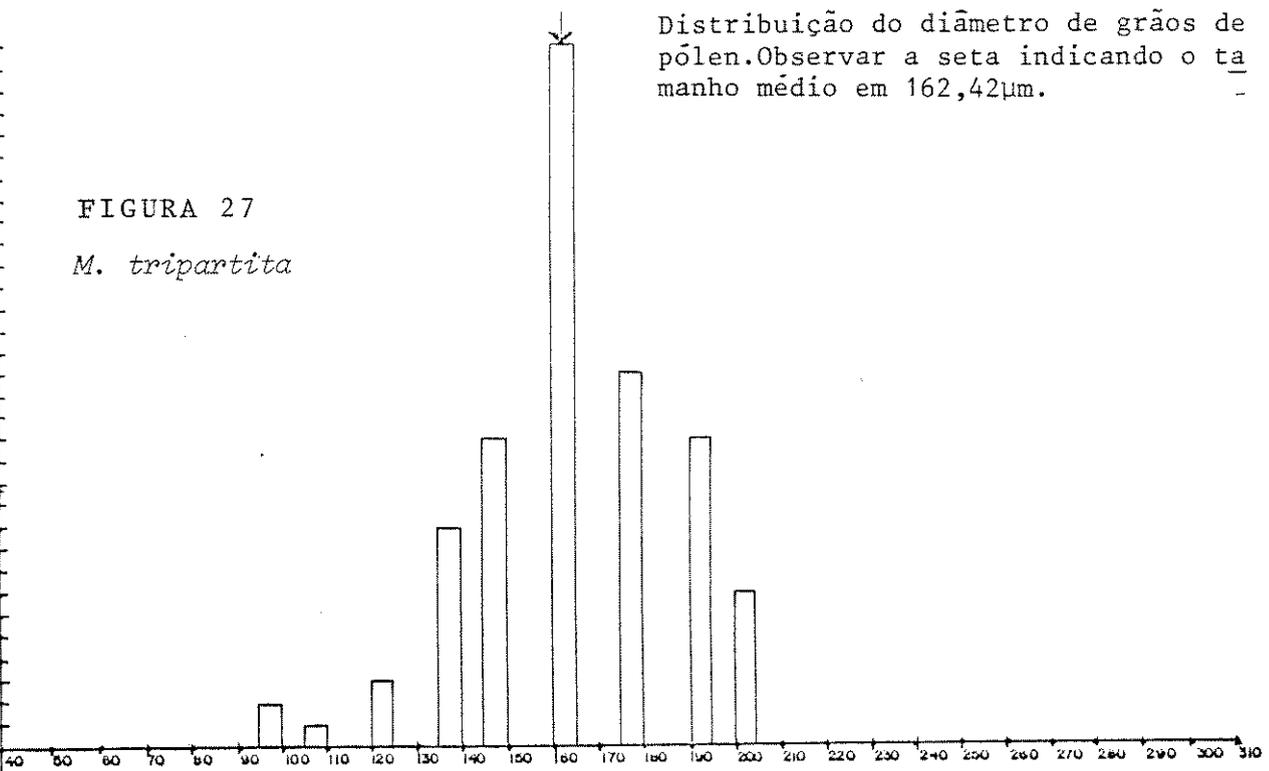


FIGURA 28
M. pilosa

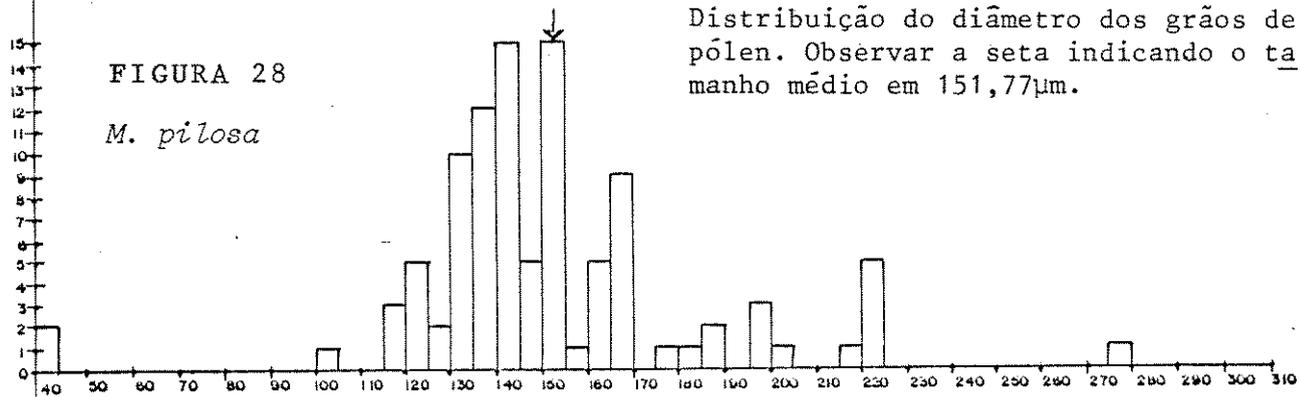


FIGURA 29
M. esculenta 'Branca de Santa Catarina'

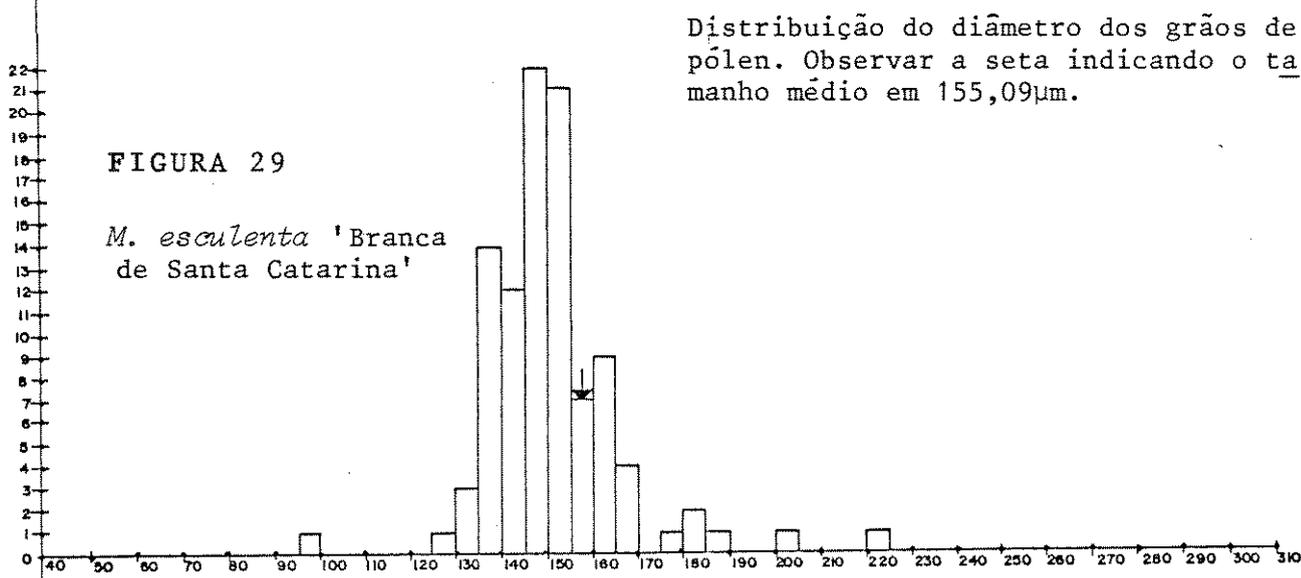


FIGURA 30
M. esculenta 'Taquari'

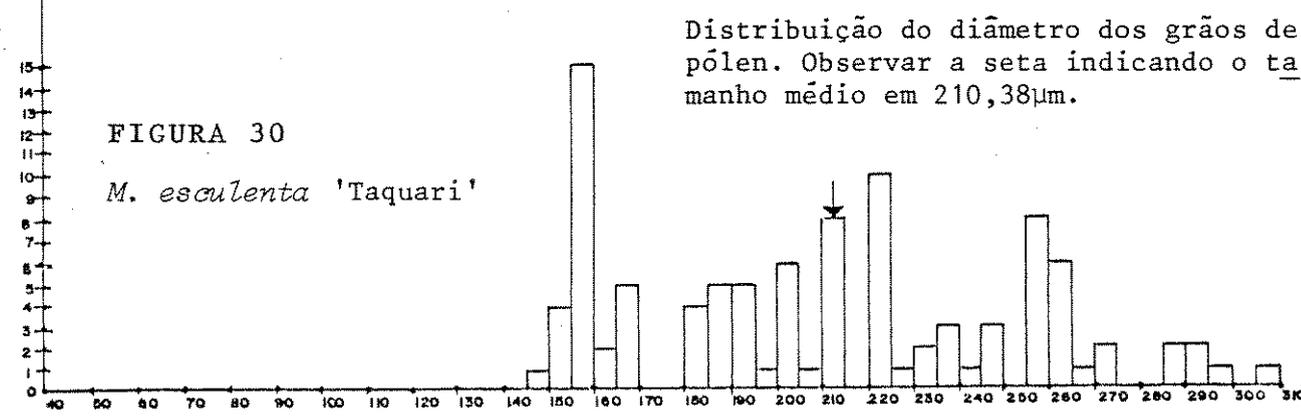


Figura 28). Observa-se, ainda, que os valores médios dos diâmetros dos grãos de pólen de *M. tripartita*, *M. pilosa* e *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina', são bastante próximos.

Verifica-se que a distribuição do tamanho dos grãos é mais discrepante em *M. tripartita*, na qual se observa, pela Figura 27, que o tamanho dos grãos obedece a um padrão menos contínuo que para *M. pilosa*, 'Branca de Santa Catarina' e 'Taquari'.

ESPÉCIE OU CULTIVAR	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	C.V.(%)
<i>M. tripartita</i>	162,42 \pm 40,03	24,24
<i>M. pilosa</i>	151,77 \pm 87,03	181,35
'Branca de Santa Catarina'	155,09 \pm 53,59	34,56
'Taquari'	210,38 \pm 88,27	41,88

TABELA 14 - Média do diâmetro dos grãos de pólen das espécies selvagens e cultivares de *Manihot* com os respectivos EPM (= erro-padrão da média) e C.V. (= coeficiente de variação).

Não foi encontrada nenhuma correlação entre a taxa de fertilidade masculina e o tamanho dos grãos de pólen. Os desvios-padrão, variância e coeficientes de variação das classes de medidas dos grãos de pólen dos materiais estudados, encontram-se na Tabela 14.

A Tabela 15 nos fornece a média de grãos de pólen viáveis, por antera, nos verticilos superior e inferior, obtidos através da contagem em 10 botões para as espécies e cultivares estudados. A mesma tabela indica, também, a média de grãos de pólen por antera, independente do verticilo e independente da viabilidade dos grãos de pólen. Pode-se observar que a média de grãos de pólen por antera é maior para *M. tripartita* (47,92 grãos/antera) e menor para *M. pilosa* (13,47 grãos/antera). Por outro lado, a média de grãos de pólen por antera, le-

vando em consideração o verticilo e a fertilidade, nos sugere que a média de grãos de pólen férteis no verticilo inferior é maior em relação à média do verticilo inferior, exceto para o 'Branca de Santa Catarina'.

ESPÉCIE OU CULTIVAR	\bar{X} DE GRÃOS POR ANTERA	\bar{X} DE GRÃOS VIÁVEIS POR ANTERA (VERTICILO SUPERIOR)	\bar{X} DE GRÃOS VIÁVEIS POR ANTERA (VERTICILO INFERIOR)
<i>M. tripartita</i>	47,92	37,86	45,90
<i>M. pilosa</i>	13,47	8,48	10,02
'Branca de Santa Catarina'	18,99	1,86	1,74
'Taquari'	16,63	10,84	19,20

TABELA 15 - Média de grãos de pólen por antera para cada espécie selvagem e cultivar de *Manihot*, para cada verticilo e independente do verticilo.

O teste de variância indicou, com relação à Tabela 15, que só é significativa a média de grãos de pólen por antera entre espécies, independentemente do verticilo e da fertilidade.

A partir dos dados das médias de flores masculinas e femininas por inflorescência, e da proporção de flor masculina por flor feminina (Tabela 5), juntamente com a média de grãos de pólen por antera (Tabela 15), foi possível construir a Tabela 16, que nos fornece o número médio de grãos de pólen para cada óvulo em uma única inflorescência.

A observação da Tabela 16 nos indica que a maior e a menor médias de grãos de pólen necessários para fertilizar um óvulo pertence a *M. tripartita* (1643,91) e *M. pilosa* (463,61), respectivamente. O comportamento mais discrepante encontra-se na espécie *M. tripartita*, enquanto que os dois cultivares de *M. pilosa* equiparam-se com a média necessária de grãos de pólen para fertilizar um óvulo, em uma inflorescência (756,96

grãos de pólen para o 'Branca de Santa Catarina', e 580,00 grãos de pólen para o 'Taquari').

ESPÉCIE OU CULTIVAR	GRÃOS DE PÓLEN POR ÓVULO EM UMA INFLORESCÊNCIA
<i>M. tripartita</i>	1643,91
<i>M. pilosa</i>	463,61
'Taquari'	580,00
'Branca de Santa Catarina'	756,96*

TABELA 16 - Média de grãos de pólen por óvulo, para cada espécie e para cultivar de *Manihot* considerados. (*) Grãos estéreis e férteis, independentemente.

4.5. Megasporogênese e Megagametogênese

O óvulo em *Manihot* é anátropo e pêndulo, como se pode verificar através das Figuras 1 e 2. Pela Figura 32, podemos notar, mais precisamente, que o óvulo apresenta uma forma ereta e a extremidade arredondada. É constituído por um nucelo, dois tegumentos (um externo e um interno), um saco embrionário e um obturador da micrôpila. A extremidade do nucelo que fica voltada para a região calazal, tem uma forma mais arredondada, enquanto que a outra porção, ou seja, aquela voltada para a região micropilar, é mais afunilada.

Na Figura 33, temos os detalhes das camadas do óvulo, onde se verifica que é bem nítido o limite do nucelo em relação ao tegumento externo. Este último, por sua vez, ultrapassa o tegumento interno, em termos de crescimento, envolvendo-o totalmente, como pode ser visto na Figura 31. Pela Figura 33, pode-se observar, ainda, que o nucelo é constituído por cerca de 5 a 7 camadas de células de tamanho maior que as dos tegu-

mentos. O tegumento interno é constituído por 7 a 10 camadas de células, e o tegumento externo possui cerca de 4 a 6 camadas de células.

Em óvulos de botões de tamanho médio (1,55-2,50mm) do 'Taquari' e da espécie selvagem *M. pilosa*, verificou-se, na megasporogênese, que o gametófito feminino é do tipo monospórico. Este apresentava uma téttrade de megásporo, sendo que três mostravam uma degenerescência, caracterizada pela ocorrência de uma coloração escura da hematoxilina, em sucessão centrípeta.

Na posição mais interna (calazal) do gametófito, foi verificada a presença de um megásporo funcional (Figura 34). O nucléolo deste megásporo funcional é circundado por um vacúolo conspícuo, reunindo, dessa forma, todo o material nuclear na periferia, conforme se observa na Figura 37.

Na megasporogênese não foram encontradas, nos óvulos analisados, figuras mitóticas e meióticas.

A megagametogênese é iniciada por três divisões sucessivas desse núcleo, para dar origem ao saco embrionário octanucleado. Contrariamente à megasporogênese, a megagametogênese se pôde ser acompanhada passo a passo. A distinção entre célula-mãe após a primeira divisão mitótica da megagametogênese, pôde ser feita através do tamanho do saco embrionário (comparando os esquemas feitos em câmara clara) e através da observação de restos de megásporos degenerados. Conforme a Figura 35, os núcleos estão em direções opostas, ou seja, um na região calazal e outro na região micropilar. Em ambos os núcleos, o nucléolo é bem proeminente. Cada um desses núcleos que estão nas extremidades entram em divisão, dando origem a quatro núcleos, e o centro da célula é ocupado por um grande vacúolo, conforme pode ser observado na Figura 36. Na Figura 38, pode-se verificar os núcleos das regiões calazal e micropilar separando-se após a segunda divisão. Esse estágio de quatro núcleos é, das etapas da megasporogênese, o mais comumente encontrado.

A megasporogênese se conclui quando cada um dos quatro núcleos sofre a sua terceira e última divisão, originando

um saco embrionário completo, com oito núcleos, conforme mostra o esquema da Figura 39 (A, B, C). Aqui temos, na região calazal, as antípodas, núcleos de morfologia mais ou menos face-tada, tendendo a triangular. Na região micropilar, temos, com uma forma mais ou menos alongada, as duas sinérgides e, entre elas, porém mais abaixo, encontramos a oosfera, morfologicamente mais arredondada. Na Figura 39 (B e C), vemos os dois núcleos polares arredondados migrando para a região central d o saco embrionário.

Apesar de os óvulos estudados serem de tamanho médio, foi comum encontrar estágios distintos de desenvolvimento do saco embrionário no 'Taquari'. A atenção foi despertada pela ocorrência de alguns óvulos atípicos, cujo gametófito apresentava números de núcleos outros que não os que caracterizam o tipo monospórico octanucleado. Na espécie *M. pilosa*, contra-riamente ao que ocorre em *M. esculenta* 'Taquari', não foram en-contrados sacos embrionários com números atípicos de núcleos. Nesta última espécie, também parece que os estágios de desenvolvivimento dos óvulos são mais ou menos uniformes.

O resultado das observações em 40 óvulos de 'Taqua-ri' e de *M. pilosa* encontram-se na Tabela 17.

ESPÉCIE OU CULTIVAR	CÉLULA-MÃE DO MEGÁSPORO	TÉTRADE DE MEGÁSPORO	MEGÁSPORO FUNCIONAL	SACO EMBRIONÁRIO 2 NÚCLEOS	SACO EMBRIONÁRIO 3 NÚCLEOS	SACO EMBRIONÁRIO 4 NÚCLEOS	SACO EMBRIONÁRIO 5 NÚCLEOS	SACO EMBRIONÁRIO 8 NÚCLEOS
'Taquari'	0	1	1	5	7	11	8	7
<i>M. pilosa</i>	0	0	0	0	0	7	0	2

TABELA 17 - Estágios de desenvolvimento do gametófito feminino de 40 óvulos estudados para 'Taquari' e *M. pilosa*, todos pertencentes a botões femininos de tamanho médio (1,55 a 2,50 μ m).

Paralelamente ao desenvolvimento do nucelo, há o desenvolvimento do obturador, o qual, como pode ser visto na Figura 31, mantém estreita relação com o nucelo e passa pela micrópila, como se fosse uma ponte entre o exterior e o inte-rior do óvulo.

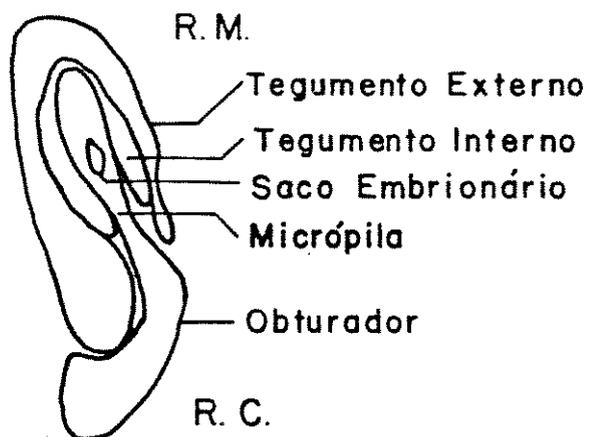


FIGURA 31

FIGURA 32

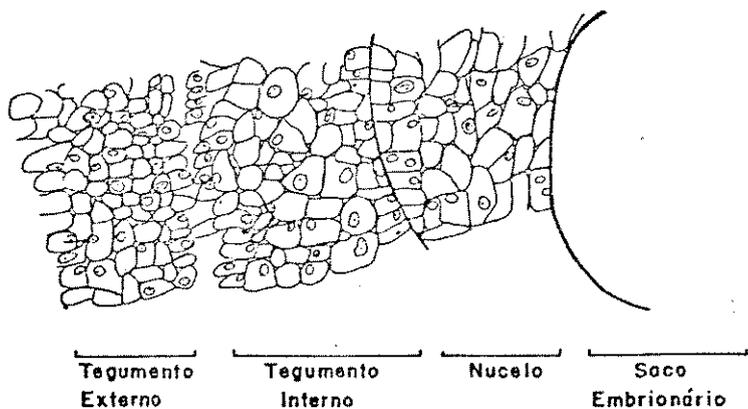
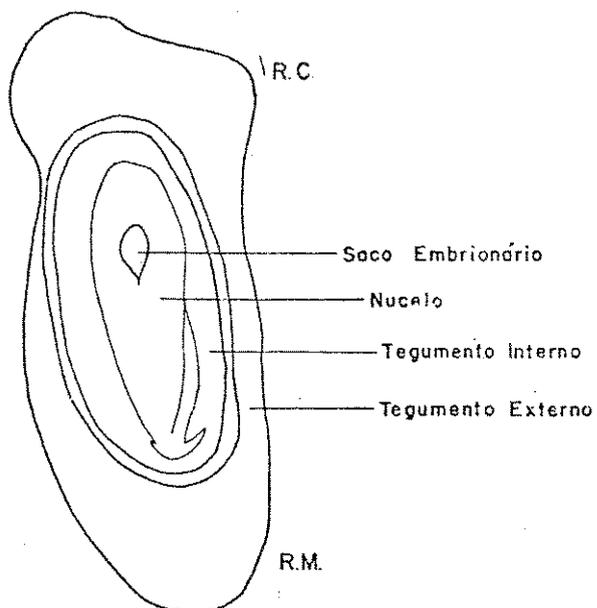


FIGURA 33

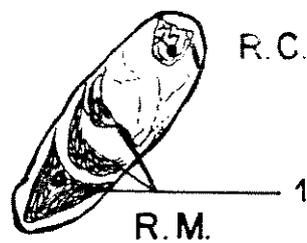


FIGURA 34

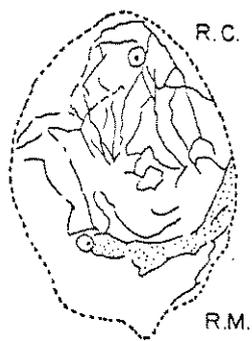


FIGURA 35



FIGURA 36

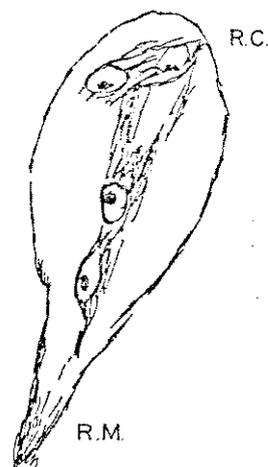


FIGURA 37

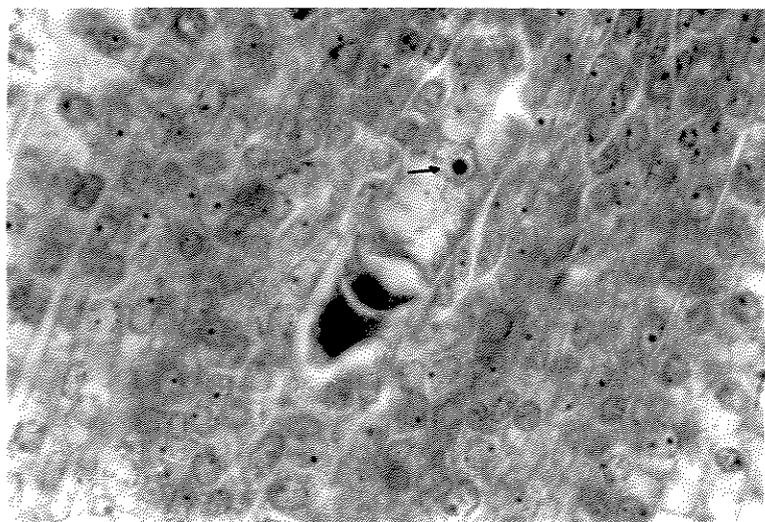


FIGURA 38



FIGURA 39 A



FIGURA 39 B

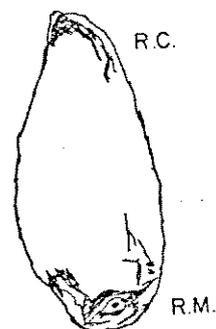


FIGURA 39 C

4.6. Observações Histológicas em Ovários Não Polinizados

Foram analisados 30 óvulos de botões femininos não polinizados do 'Taquari', com um dia após a antese da flor e 38 óvulos também de botões femininos não polinizados do 'Taquari', com 6 dias após a abertura da flor (Tabela 18). No primeiro caso verificou-se que, apesar dos sinais de degenerescência, ainda era possível a identificação de alguns núcleos. No material com 6 dias após a antese, encontrou-se um estágio bem mais avançado de degenerescência; contudo, a oosfera e os núcleos polares puderam ser observados na maioria dos casos.

Na Tabela 18 é possível verificar que, tanto após um dia de antese, quanto após 6 dias de antese, a situação mais comum do saco embrionário é a presença de núcleos e da oosfera. Aos 6 dias após a antese, sem ter havido polinização, pode-se encontrar um grande número de sacos embrionários totalmente degerados (cerca de 15), conforme mostra a Tabela 18.

IDADE (DIAS) DO ÓVULO APÓS A ANTESE E SEM POLINIZAÇÃO	NÚMERO DE ÓVULOS EXAMINADOS	SACO EMBRIONÁRIO COMPLETO E COM NÚCLEOS EM DEGENERESCÊNCIA	SACO EMBRIONÁRIO COM OOSFERA, SINÉRGIDES E NÚCLEOS POLARES	SACO EMBRIONÁRIO COM NÚCLEOS POLARES E OOSFERA	SACO EMBRIONÁRIO COM OOSFERA	SACO EMBRIONÁRIO EM DEGENERESCÊNCIA
1	30	3	2	15	8	2
6	38	0	0	23	0	15

TABELA 18 - Resultado da análise do saco embrionário de 'Taquari' de óvulos com um dia e seis dias após a antese, sem ter ocorrido polinização.

4.7. Germinação do Tubo Polínico

Ovários do 'Taquari' colocados em placa de Petri, contendo ágar como substrato, foram autopolinizados e, 6 horas após se ter efetuado a autopolinização, verificou-se, em lâminas, que os tubos polínicos já se encontravam germinados na papila estigmática, apesar da coloração com fucsina ter ficado

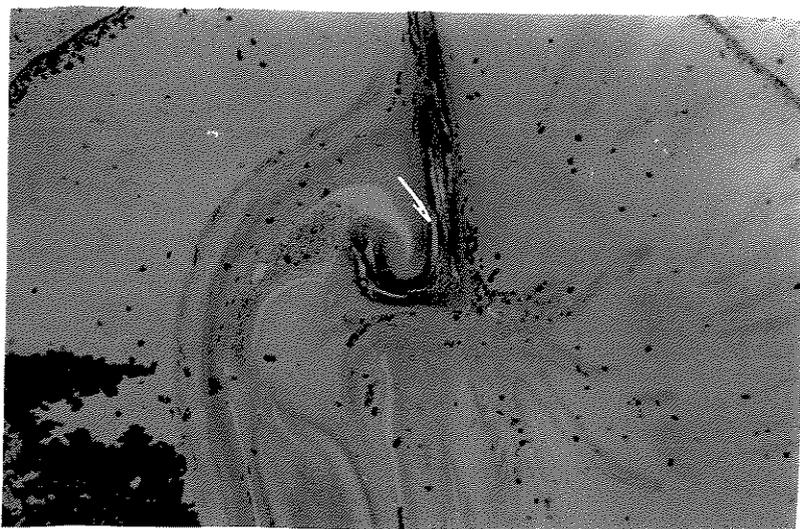
muito intensa e de ter sido difícil o esmagamento do material, que se encontrava muito enrijecido. Na tentativa de se minimizar esses problemas, aumentou-se a permanência dos ovários em ácido lático 85%, conforme procedimento descrito na Metodologia (item 3). Apesar de, com isso, a coloração intensa não se ter solucionado de maneira satisfatória, o esmagamento tornou-se mais fácil.

4.8. Estudos Histológicos de Ovários Polinizados

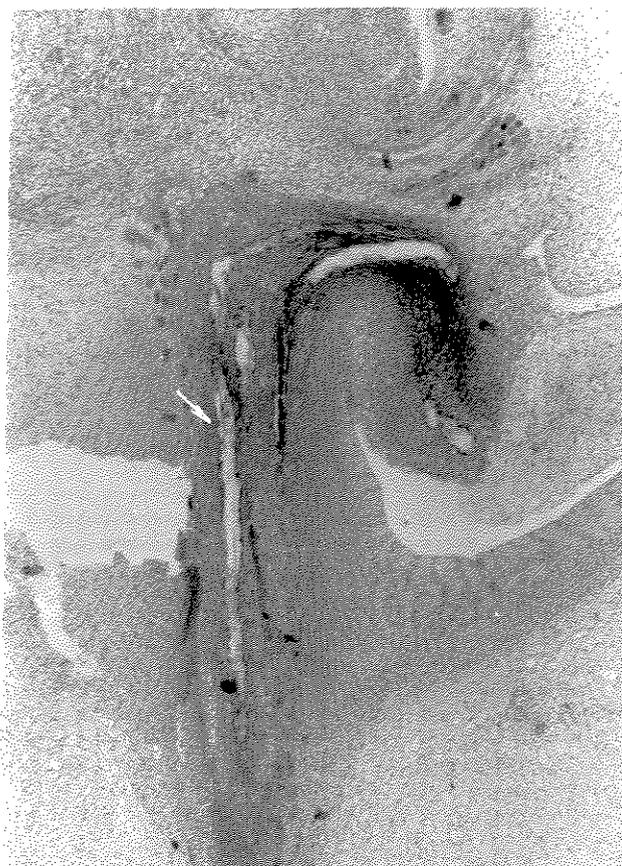
Das flores do 'Taquari' que foram polinizadas no campo, fez-se primeiramente a análise do material de dois dias e de três dias após a polinização. Em alguns cortes, foi possível verificar a germinação do tubo polínico no estigma, e o crescimento desse tubo até atingir o óvulo pôde ser seguido em alguns cortes, conforme temos: o tubo polínico passa pelos tecidos do estilete e atinge o obturador. Através desse último, o tubo polínico entra no óvulo pela micrópila. É interessante observar que, à medida que o tubo polínico passa pelo estilete, ele promove alterações nos tecidos, de forma que se observam várias lacunas por todo o tecido do estilete por onde passou o tubo. Esses eventos podem ser acompanhados pela seqüência A, B, C e D da Figura 40.

No interior do saco embrionário do 'Taquari' de dois dias após a polinização, não foi possível observar a presença do tubo polínico, porém, foi possível verificar alterações que indicam a ocorrência do tubo no interior do saco embrionário. Uma das sinérgides parece ser destruída com a entrada do tubo. No local em que supostamente se encontraria uma sinérgide, foi verificada, na maioria dos cortes, uma coloração muito intensa de hematoxilina em restos de material degenerado (Figura 41).

Apesar de as etapas subseqüentes à entrada do tubo polínico no saco embrionário serem sempre marcadas pela coloração intensa de hematoxilina, em um outro corte foi possível

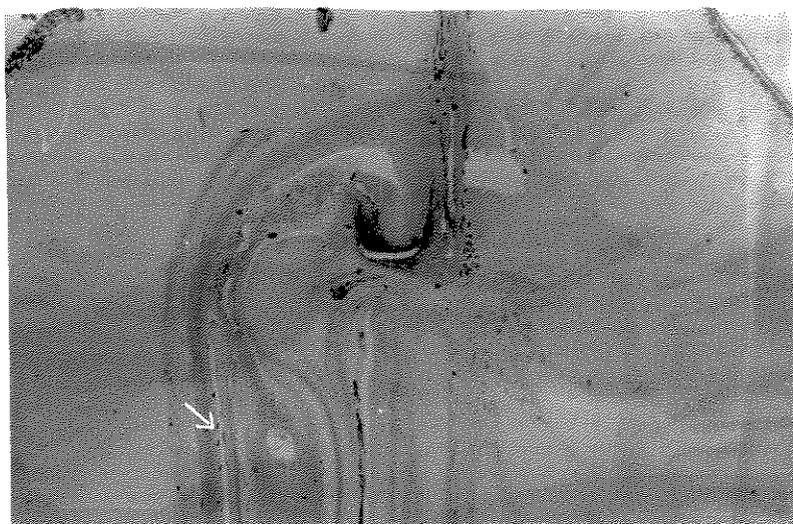


(A)

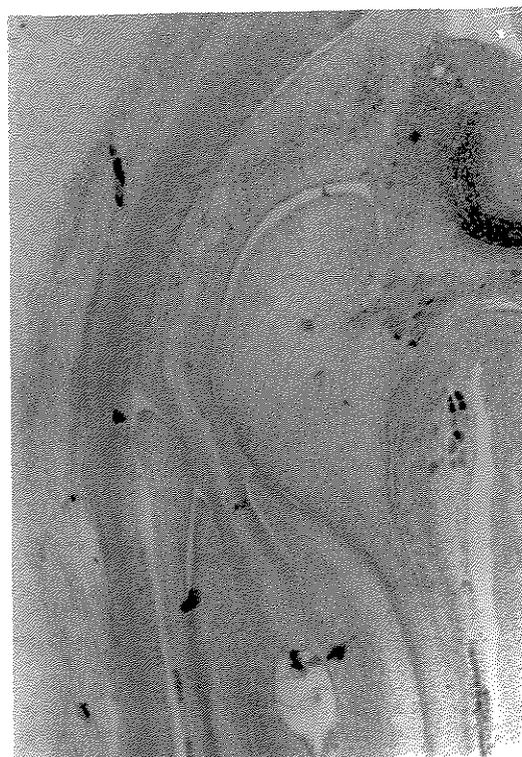


(B)

FIGURA 40 (A, B) - *M. esculenta* 'Taquari' - A seqüência A, B indica a passagem do tubo polínico pelos tecidos do estilete. Em (B) nota-se a presença intensa das lacunas. x 800



(C)



(D)

FIGURA 40 (C,D) - *M. esculenta* 'Taquari' - Em (C) e (D) nota-se a entrada do tubo polínico pela micrópila. Em (D) já se observa o saco embrionário alterado com a presença de núcleos masculinos. x 800

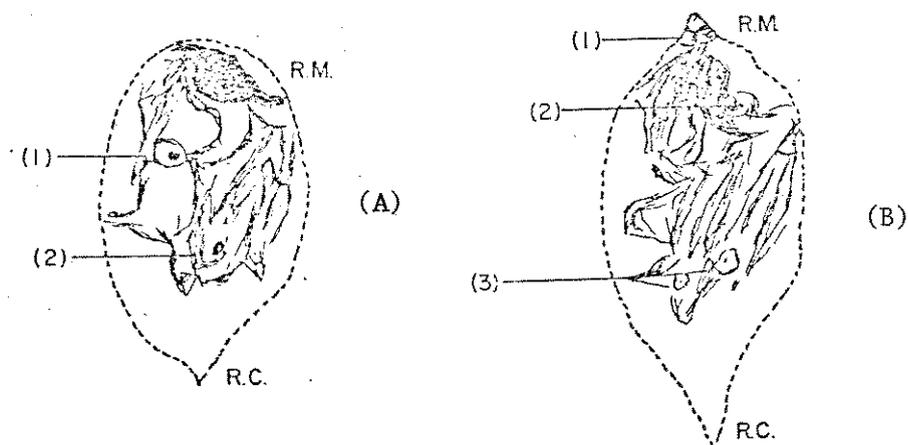


FIGURA 41 - *M. esculenta*'Taquari'.

Dois dias de polinização: observa-se alterações que indicam a ocorrência do tubo polínico no interior do saco embrionário. No local da sinérgide existe coloração intensa, indicando material degenerado.
x 600

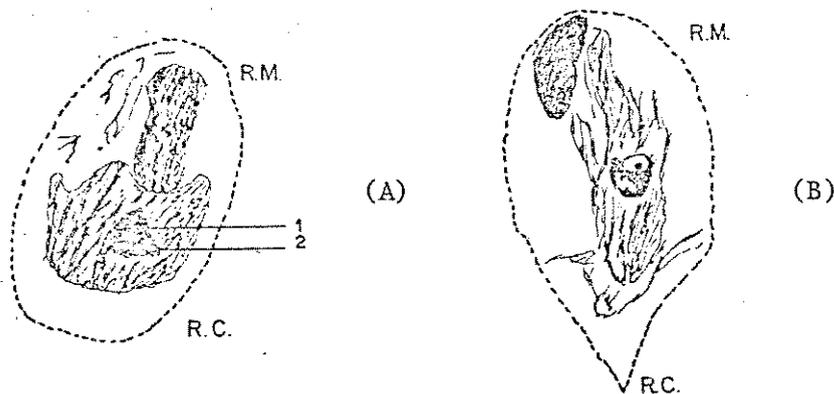
detectar um núcleo que, pela posição, poderia ser inferido como sendo outra sinérgide. Pela coloração bastante forte e pelo tamanho relativamente grande de dois núcleos, com a sua posição sempre oscilando, de um óvulo para outro, entre o centro do saco embrionário ou regiões próximas de sua extremidade, pode-se supor que esses dois núcleos sejam os núcleos polares. É também notório, quer pela grande intensidade de coloração, quer pelo grande tamanho, a ocorrência da oosfera. A oosfera é facilmente reconhecida pela analogia com o material não polinizado. Observa-se sempre, ao redor do nucléolo, a presença de um grande vacúolo. Um fato interessante é que, no material polinizado, nem sempre a oosfera se encontra próxima à região micropilar; muitas vezes, observa-se a sua presença na região calazal. Muito difíceis de serem observadas, na grande maioria dos sacos embrionários, foram as antípodas. Contudo, puderam ser vistos, em um dos materiais, três núcleos quase totalmente degenerados, na região calazal, e se supôs tratar-se das antípodas. Essa descrição do aspecto do saco embrionário após dois dias de polinização, pode ser acompanhada na Figura 42 (A e B).

FIGURA 42 (A, B)



Em um único óvulo, aos dois dias de polinização, foi possível observar a fusão de um gameta com dois núcleos polares já fundidos. Também foi possível verificar nesse óvulo, a oosfera no estágio binucleado, porém indiviso. Esses eventos podem ser acompanhados pela Figura 43 (A e B).

FIGURA 43 (A, B)



No material de três dias de polinização, observou-se uma situação bastante diversa, isto é, começou a ser formado o endosperma nuclear. Nesse material, praticamente já quase não se distinguem mais a sinérgide, nem as antípodas. A oosfera pode ainda ser facilmente reconhecida. Nessa idade de 72 horas de polinização, o aspecto do saco embrionário já é bastante modificado em relação ao saco embrionário de 48 horas de polinização; apesar disso, às vezes, pode-se observar dois núcleos que se supõe serem os núcleos polares. A seqüência da Figura 44 (A, B, C, D, E) ilustra a presença de núcleos no saco embrionário, bem como, a formação do endosperma em material de três dias de polinização. Essa seqüência de figuras corresponde a um mesmo óvulo.

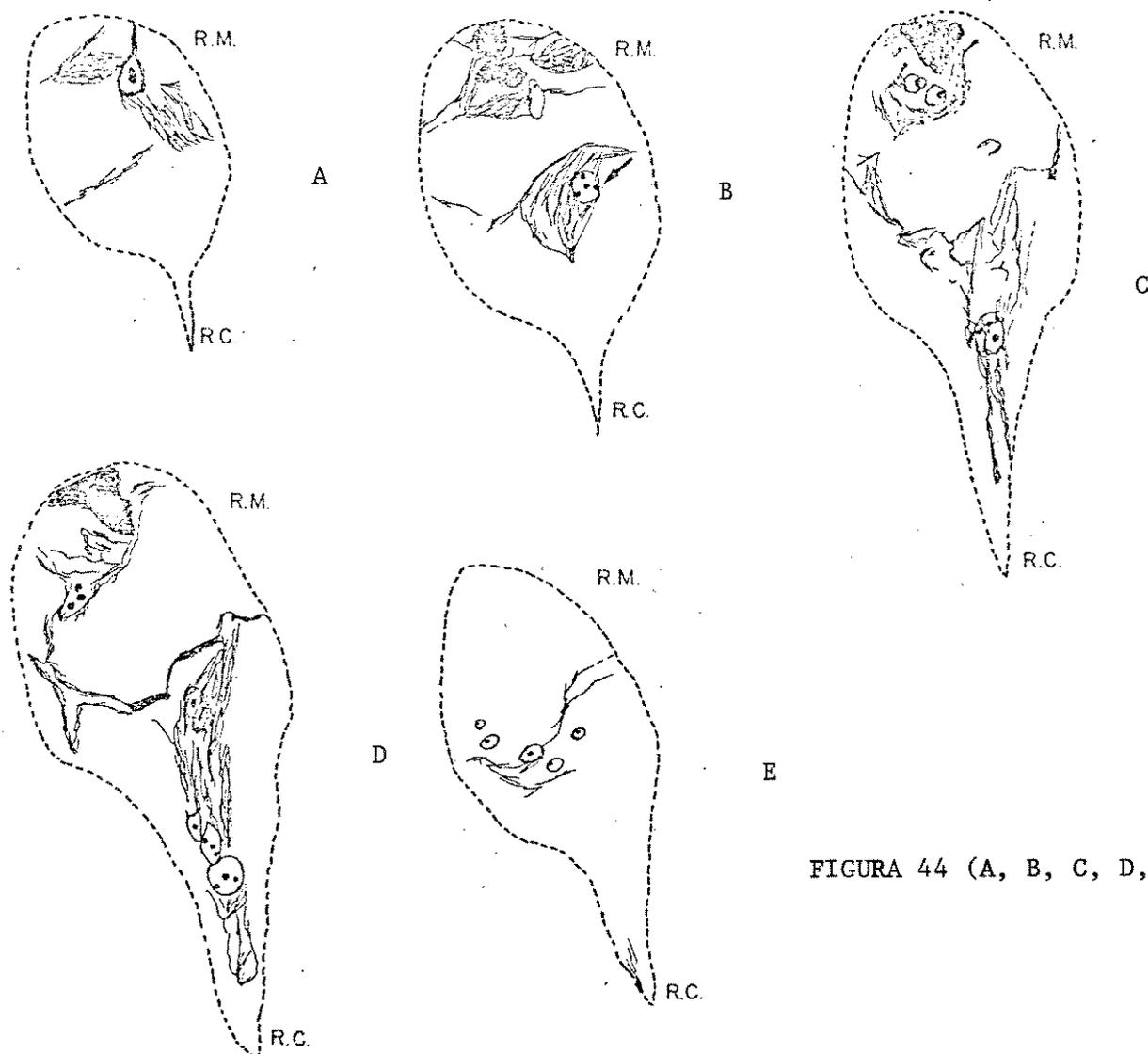


FIGURA 44 (A, B, C, D, E)

A Tabela 19 nos fornece, de maneira resumida, o número de óvulos examinados após dois dias de polinização e, em cada um deles, o resultado da observação do saco embrionário.

IDADE DO ÓVULO APÓS A POLINIZAÇÃO	NÚMERO DE ÓVULOS EXAMINADOS	SACO EMBRIONÁRIO COMPLETO	FERTILIZAÇÃO COM TRIPLA FUSÃO	OOSFERA E ENDOSPERMA COM 3 A 11 NÚCLEOS	OOSFERA E ENDOSPERMA COM 12 A 21 NÚCLEOS
2	3	2	1	0	0
3	10	0	0	6	4

TABELA 19 - Resultado da análise do saco embrionário de óvulos de 'Taquari' com 2 e 3 dias após a polinização controlada.

4.9. Clarificação dos Óvulos

Na tentativa de se agilizar os cortes histológicos, foram confeccionadas lâminas de óvulos submetidos à técnica de clarificação, porém, as lâminas não se mostraram satisfatórias. Tanto as alterações feitas na solução clarificadora, quanto os tratamentos alternativos (conforme citado na Metodologia - item 4), não se mostraram eficazes; contrariamente, muitas alterações produziram efeitos mais negativos. Os resultados pouco satisfatórios a que nos referimos, são relativos à observação do saco embrionário, observação essa que foi praticamente impossível.

Dentre os diversos períodos de tempo em que se manteve os óvulos no líquido clarificador, o período em que se verificou uma maior proximidade da obtenção de transparência nos ovários, foi quando da manutenção dos ovários por 6 horas no referido líquido. O período de 8 horas também foi favorável. Contudo, ainda assim, não foi possível a observação satisfatória do saco embrionário.

4.10. Acúmulo de Substância de Reserva no Núcleo e no Saco Embrionário

Um dos maiores problemas encontrados na investigação do óvulo, foi a presença, bastante comum, de uma substância de reserva, em forma de pequenas gotículas, que se acumula no núcleo do óvulo e, principalmente, no saco embrionário, mascarando os núcleos. Todos os gametófitos que se apresentaram com essa substância, tiveram que ser eliminados, para que não se incorresse em interpretações errôneas.

Quando o material foi submetido ao microscópio com luz polarizada, o plano de luz foi desviado conforme um padrão característico e que pode ser observado na Figura 45, o que su

geriu que tal substância seria um cristal.

O teste com SUDAN IV e Lugol não deu resultados positivos. Embora o teste com Lugol não tenha dado coloração, o teste com Iodina com KI demonstrou que a substância em questão poderia ser o amido, uma vez que, após poucos minutos (cerca de 3 a 5 minutos) da aplicação do corante, a região do nucelo e do saco embrionário tornou-se totalmente escura.

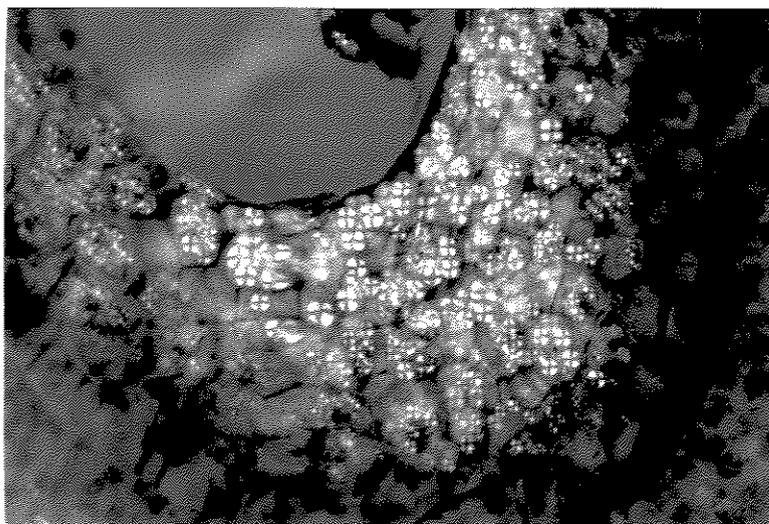


FIGURA 45 - *M. esculenta* 'Taquari' - Neste corte longitudinal de um ovulo de ovário de tamanho médio, pode-se observar o padrão característico do desvio do plano de luz polarizada, promovido pela presença de cristais acumulados no nucelo e saco embrionário. (x 600)

5. D I S C U S S Ã O

5.1. Fenologia e Barreiras Intraespecíficas

As espécies e cultivares de *Manihot* são plantas monóicas com flores pistiladas e estaminadas na mesma inflorescência (HERSHEY & AMAYA, 1982). Os resultados obtidos (Tabela 5), mostram que tanto a média de flores masculinas (cerca de 60) quanto femininas (cerca de 50), é próxima para os dois cultivares e para as duas espécies selvagens, em uma proporção em torno de 10 flores masculinas para cada flor feminina. Esses resultados estão totalmente de acordo com GRANER (1942a) que, trabalhando com o 'Vassourinha Paulista', mesmo não fazendo uma contagem sistemática das flores masculinas e femininas, sugeriu médias de 50 flores masculinas e 6 flores femininas por inflorescência.

Apesar de nossos resultados terem concordância com aqueles sugeridos por GRANER (1942a), é necessário que se considere alguns fatores que podem ser relevantes o suficiente para alterar as médias aqui obtidas, o que pode justificar o alto coeficiente de variação (Tabela 5). Esses fatores poderiam ser agrupados em três categorias: (1) amostragem - as contagens dos botões masculinos e femininos nas inflorescências das espécies *M. tripartita* e *M. pilosa* foram feitas em um pequeno número de indivíduos (dois para *M. tripartita* e três para *M. pilosa* - item 3.2.3), sendo coletadas cinco inflorescências por planta; (2) genética - trabalhou-se com um material de propagação vegetativa; portanto, em relação aos cultivares, trabalhou-se com um só genótipo, e não se pode extrapolar os resul-

tados para outros clones dos cultivares 'Taquari' e 'Branca de Santa Catarina', que diferem destes na constituição genética. Quanto às espécies selvagens, também não se conhece a origem genética do material que se trabalhou; logo, estender os resultados para outros representantes dessas duas espécies seria temerário; (3) ambiental - o desenvolvimento dos botões florais está sujeito a muitas variantes do ambiente físico. Entre as mais importantes tem-se: luz (fotoperíodo, intensidade e qualidade); temperatura (termoperíodo e extremos); suprimento de umidade no solo e regime de umidade relativa da atmosfera; suprimento de nutrientes do solo (FRANKEL & GALUN, 1977).

Outros fatores ambientais têm significância para os resultados obtidos. Há variação, por exemplo, na posição da linha que a planta ocupa, havendo, portanto, plantas que recebem mais sol do que outras (é o caso de plantas de extremidade de linhas). Em mandioca, a ramificação é consequência do florescimento; este, também é muito dependente da temperatura e do comprimento do dia (GRANER, 1942a; CONCEIÇÃO, 1981; HERSHEY & AMAYA, 1982). A mesma situação transparece ao se considerar a ramificação em que se coletam as inflorescências. Talvez possam existir diferenças quanto ao número de flores nas inflorescências da primeira ramificação, em relação às inflorescências de segunda ramificação, e assim por diante. Esta suposta diferença seria não somente pela idade da ramificação, como pelo estrato que a ramificação ocupa na planta. É evidente que as últimas ramificações ocupam um estrato superior, havendo aí, a citada influência da luz solar.

Outro fator de influência é a sanidade das inflorescências; GRANER (1942a) afirmou que o ataque das moscas nos botões masculinos é um fator decisivo no florescimento e na polinização.

Uma vez colocadas estas considerações, os resultados obtidos acerca do número de flores masculinas e femininas por inflorescência, tem uma certa relevância, se for observada a taxa de fertilidade masculina na Tabela 13. Por essa tabela, pode-se dividir as espécies em três classes de fertilidade masculina: muito alta ('Taquari' 95,43% e *M. tripartita* 93,30%);

alta (*M. pilosa* 67,30%) e baixa ('Branca de Santa Catarina' , 0,69%). Da mesma forma, na Tabela 8 pode-se separar em três classes distintas a média de flores masculinas por inflorescência: muito alta ("Branca de Santa Catarina" 83,35%); alta (*M. pilosa* 65,36%) e baixa ("Taquari" 61,0% e *M. tripartita* 60,0%). A análise dessas classes de fertilidade masculina, comparadas com as três classes do número de flores masculinas por inflorescência, sugere uma possível correlação entre elas, que no caso, seria inversamente proporcional. Deve-se, contudo, fazer uma análise mais detalhada em cultivares e em espécies, quanto à essa afirmação, uma vez que os cultivares são resultado da interferência do homem. Logo, esses dados não podem, se analisados de forma mais minuciosa, ser unificados para a comparação entre as espécies selvagens e os cultivares. Ainda, as proporções de flores femininas, tanto para os cultivares de *M. esculenta*, quanto para as espécies silvestres, são praticamente as mesmas, não havendo diferenças significativas, o que sugere que deve ser bastante rígido o controle genético para a produção das flores femininas, as quais são responsáveis pela reprodução. Se assim o for, mesmo nos cultivares, que vêm a ser o reflexo da manipulação do homem, no caso, na espécie *M. esculenta*, indica que realmente é rígido esse controle genético, pois nem as condições inerentes aos cultivares alteram essa proporção.

O tempo, a duração e a frequência do florescimento são fatores importantes relacionados com o comportamento do polinizador. Esses estudos são a essência da fenologia (SIMPSON & NEFF, 1983). As diferenças sazonais, como influência para a produção de flores dentro e entre espécies congêneras simpátricas, são um aspecto bastante conhecido da diversidade fenológica. Tais diferenças podem não apenas permitir o isolamento efetivo das espécies, mas também, levar à diversidade dos polinizadores (LEVIN, 1978). O florescimento e a frutificação podem ser considerados como processos associados a uma série de fenômenos vantajosos e desvantajosos, cada um deles variando com a espécie e com o indivíduo (JANZEN, 1967). A mandioca floresce regularmente, iniciando o processo aos seis meses de idade (GRANER, 1942a). Pela Tabela 6, pode-se notar que entre um ciclo e outro do florescimento houve uma variação na média de

inflorescência por planta e, também, no mês em que inicia ou finda a floração. Isso pode ser atribuído às variantes do clima. Segundo BAWA (1983), os valores extremos de uma assincronia no florescimento, para uma completa sincronização, varia de um ano para outro, na mesma população.

Considerando-se as Figuras 5, 6, 7 e 8, referentes à fenologia, observa-se que, para *M. pilosa* (Figura 5), e *M. tripartita* (Figura 6), bem como para o 'Taquari' (Figura 8), o maior pico de florescimento ocorreu no 3º ciclo (1982/83) que, pela Tabela 7, corresponde ao maior volume de chuva (2131,74) e à maior temperatura média (22,3°C). O 'Branca de Santa Catarina' (Figura 7), contrariamente, teve, nesse ciclo, a menor intensidade de florescimento. Talvez isso se deva ao fato desse cultivar ser muito susceptível ao ataque de moscas do broto. A temperatura média elevada e as condições mais acentuadas de umidade, podem ter promovido um sensível aumento dessas moscas, o que teria levado à diminuição do florescimento. Suposições dessa natureza seriam efetuadas de maneira mais concreta, caso houvesse um maior embasamento experimental (um número elevado de ciclos acompanhados); deveria, também, ser feito (por diversos anos) um estudo sobre a luminosidade, temperatura e umidade, além de se testar as espécies e cultivares em ambientes diversos. Seria interessante que os estudos de fenologia fossem acompanhados de dados quanto à susceptibilidade das espécies, ou cultivares de *M. esculenta*, aos múltiplos agentes de injúria, a fim de se determinar a oscilação dos insetos e do florescimento.

Foi a espécie *M. pilosa* (Tabela 6, Figura 5), que apresentou, em relação ao volume de chuva (Tabela 7), o florescimento mais uniforme entre um ciclo e outro. Dois fatores poderiam ser levantados para uma possível explicação:

- (1) o reflexo da baixa susceptibilidade dessa espécie à mosca do broto. Um parâmetro para confirmar isto poderia ter sido tomado com *M. tripartita* (que também não é suscetível), mas, como já foi citado, essa espécie não pôde ser acompanhada no 2º ciclo;
- (2) talvez *M. pilosa* esteja bem adequada às condições em que

se encontra, favorecendo um florescimento satisfatório, a despeito das variantes climáticas.

Os picos atingidos no florescimento (Figura 9), foram maiores para as espécies selvagens, seguidas do 'Taquari' e, por fim, do 'Branca de Santa Catarina'; isso pode ser o reflexo da não susceptibilidade do 'Taquari', o que permite uma maior produção de flores; ou, então, o cultivo pode ter minimizado o florescimento. Conforme GANESHIAH & SHAAKER (1982), as espécies selvagens de *Eleusine* levam mais tempo para completar o seu florescimento (8 a 10 dias) que a espécie domesticada (4 a 5 dias), o que vem a ser uma "tática" das espécies selvagens eliminada com a domesticação.

Segundo AUGSPURGER (1978) apud BAWA (1983), a duração do florescimento refere-se à toda extensão do período em que há alguma flor. Existe uma considerável variação entre as espécies, com respeito ao número de flores produzidas por unidade de tempo. Há aquelas que florescem intensamente, por um ou poucos dias, e as espécies que produzem poucas flores por dia, por um longo período de tempo, período esse que pode se estender de várias semanas até vários meses, como foi verificado por FRANKIE et al. (1974) apud BAWA (1983), em *Muntingia calabura*. Pela Tabela 8, pode-se observar que tanto *M. esculenta* quanto *M. tripartita* e *M. pilosa*, têm cerca de 6 a 7 meses de florescimento. EHRENFELD (1976) estudou a biologia da reprodução das espécies invasoras *Euphorbia capitellata*, *E. albomarginata* e *E. hyssopifolia*, encontrando nelas uma longa estação de florescimento, crescimento rápido e produção de sementes por plantas jovens. Esta combinação de características promove a variação genética necessária, ano após ano, e a uniformidade genética que favorece a rápida colonização a cada ano.

O longo período de florescimento traz, segundo BAWA (1983), algumas vantagens:

- (1) passa a existir um melhor controle de recursos para a produção de frutos;
- (2) nas populações alógamas, isso aumentaria a oportunidade in

dividual de fertilizar um grande número de indivíduos e, ao mesmo tempo, incrementaria a receptividade do pólen de vários doadores de genótipos distintos. Em termos do gênero *Manihot*, essa citação de Bawa é bem adequada ao considerado por RENVOIZE (1972), de que no Brasil, a grande abundância de espécies e a variabilidade varietal, podem ter tido condições particularmente favoráveis para a hibridação e o desenvolvimento de novas variedades de mandioca;

- (3) a produção de poucas flores por unidade de tempo, poderia reduzir a geitonogamia. Em mandioca, e nas espécies selvagens do gênero, particularmente, a geitonogamia deve ser relativamente comum, quer por observações nossas, em campo, quer pelo que pode ser depreendido de citações diversas (GRANER, 1942a; CONCEIÇÃO, 1981; HERSHEY & AMAYA, 1982);
- (4) o florescimento extensivo diminui o risco de falhas na reprodução. Esse aspecto, dentre os considerados acima, talvez seja o de maior relevância para *Manihot*. Pois, segundo cálculos teóricos de GRANER (1942a), o número de sementes que uma planta de mandioca pode produzir, é muito pequeno. Considerando como ótima a ramificação (3 vezes), haveria 13 inflorescências, cada qual com 6 flores femininas (totalizando 78 flores femininas e, se em cada uma dessas flores se desenvolvesse em 3 sementes, haveria, no máximo, e em condições extremamente satisfatórias, 234 sementes por planta). Isso praticamente não ocorre: conforme citado nos nossos resultados, há um número elevado de frutos biloculares, há frutos com lóculos vazios, sementes inviáveis, e a taxa de germinação, ou de produção de sementes, é baixa (Tabela 9), além dos variados graus de susceptibilidade. Esse número de inflorescências deve, certamente, variar com o fato de algumas espécies selvagens, assim como as cultivadas, tuberizarem, o que leva a uma alocação de energia para a formação dos túberes em detrimento da formação das inflorescências, fato que não deve ocorrer nas espécies selvagens que não tuberizam, como foi o caso daquelas utilizadas neste trabalho. Seria muito interessante estudar o florescimento em espécies selvagens que tuberizam e em espécies selvagens que não tuberizam, para quantificá-lo e melhor comparar.

Quanto à menção, nos resultados, de ser o florescimento de *M. tripartita* em saltos, pode-se supor que seja uma característica específica, ou mesmo do indivíduo com o qual trabalhamos nessa espécie. Conforme AUGSPURGER (1980), uma característica que poderia produzir fluxo gênico reduzido é o florescimento maciço em plantas individuais. Mas isso não deve ser totalmente generalizado, uma vez que o florescimento, sendo intenso, mesmo por um curto período, mas havendo nesse período disponibilidade de polinizadores, não há de se esperar uma redução no fluxo gênico, principalmente se considerarmos ser normalmente aceito que o florescimento é mais uma função dos polinizadores do que da própria planta, a qual se adapta às exigências do agente que a poliniza. Além do mais, o florescimento maciço em plantas individuais favorece a geitomogamia, e esse deve ser um fator de bastante peso para *M. tripartita*.

Entre as espécies, a fenologia do florescimento de plantas individuais varia marcadamente. Segundo citações de GENTRY (1974), entre outros, os indivíduos de uma população podem florescer por períodos tão curtos como um dia, ou tão longos quanto um ano; várias vezes em um ano; uma vez, por poucos anos, ou, ainda, uma ou muitas vezes no seu tempo de vida. GENTRY (1974) descreveu cinco tipos de padrão de florescimento em Bignoniaceae, e muitas espécies podem ser distintamente classificadas pelo seu padrão de florescimento em relação a outras. Isso deixa claro o quanto deveria ser estudada a fenologia de *Manihot*, quer para fornecer subsídios para a origem e evolução da mandioca, quer para auxiliar o seu melhoramento.

Os dispositivos que existem para a manutenção da separação entre as espécies, foram desconhecidos por muito tempo. São em épocas mais recentes os evolucionistas reconhecerem a importância desses mecanismos, quando DOBZHANSKY (1937) apud MAYR (1977) os denominou de "mecanismos de isolamento". De um modo geral, os autores (JENNINGS, 1959; ROGERS, 1965; CRUZ, 1968; NASSAR, 1980) que tratam da hibridação natural no gênero *Manihot*, parecem concordar que, nesse gênero, esses mecanismos de isolamento não ocorrem.

Quanto à hibridação natural em *Manihot*, CRUZ (1968)

menciona: "Levando em conta o abundante número de espécies e variedades, algumas na mesma área geográfica e época de florescimento, que é mais ou menos a mesma para a maioria delas, tem-se que admitir a porcentagem alta de hibridações naturais atuando na especiação...". E, no parágrafo seguinte, a autora diz: "Se as hibridações interespecíficas realmente ocorrem, e se existir fertilidade nas gerações provenientes destes cruzamentos...".

Com relação a isto, alguns pontos merecem ser levantados:

(a) CRUZ (1968) afirma, inicialmente, que admite uma alta taxa de hibridação natural no gênero e, em seguida, já com mais cautela, tenta dizer que pode ser que exista alta taxa de hibridação em *Manihot*, o que nos indica um paradoxo: a autora acredita ou supõe a existência de elevada taxa de hibridação natural no gênero?

(b) A autora se detém em apenas dois fatores para admitir a hibridação no gênero: simpatria e coincidência no florescimento, o que, a nosso ver, são insuficientes e demasiado tênues:

(b.1) O fato de as espécies ocorrerem na mesma área geográfica não significa que não exista isolamento entre elas. A título de exemplos, pode-se mencionar alguns trabalhos desenvolvidos à mesma época que os de CRUZ (1968), apenas para manter os contra-argumentos aqui apresentados, no mesmo período histórico do trabalho da autora em questão: HADLEY & LEVIN (1967) mencionam que três espécies de *Liatris* ocorrem em áreas sobrepostas, em Illinois - EEUU, mas em posições diferentes, em uma descida branda, de apenas 10 metros de extensão: *L. aspera* ocorre na porção mais alta do declive, *L. cylindracea* ocorre no centro e *L. spicata* ocorre na porção mais baixa e, também, nas depressões que eventualmente existem no topo. Em algumas poucas áreas as três espécies aparecem misturadas, mas a análise do substrato, mostra que embora juntas, cada espécie está fixada em um tipo diferente de substrato, o que continua a mantê-las isoladas. Inúmeros outros exemplos existem e, para não nos estendermos muito, poderíamos mencionar apenas o caso de *Eucalyptus*, segundo McCOLL (1969) apud LEVIN (1978) e

Quercus, segundo WHITAKER & NERING (1965) apud LEVIN (1978), que também mencionam o isolamento ecológico;

(b.2.) quanto à época semelhante de florescimento, pelos nossos resultados (Tabela 8 e Figura 9), verificamos que, embora haja coincidência no florescimento, o ótimo de floração para *M. pilosa* é em janeiro, ao passo que para *M. tripartita* é em fevereiro e a espécie *M. esculenta* tem, no mês de março, o pico de florescimento para ambos os cultivares. Dessa forma, quando uma espécie ou cultivar dispõe de flores em abundância, a outra já se encontra ou em processo de diminuição do florescimento, ou ainda não atingiu o seu ideal de floração (Tabela 8), ocupando, então, pontos extremos, conforme se observa na Figura 9. Essas inflorescências iniciais ou finais apresentam flores miúdas, menos viçosas e, às vezes, atrofiadas e de viabilidade incerta, o que deve ser o reflexo de uma condição nutricional precária, não havendo garantias para assegurar sucesso nas eventuais polinizações. Esta barreira de isolamento temporal que estamos sugerindo, não é, contudo, absoluta, o que não impede que haja algum fluxo gênico entre as espécies, quer quando se considera polinizações naturais, quer quando se considera as artificiais. STYLES (1977) estudou a fenologia de onze plantas tropicais polinizadas por beija-flor e concluiu que os picos de tempo do florescimento foram uniformemente espaçados e interpretou esse espaçamento como uma competição pela polinização por beija-flor, aumentando a eficiência da polinização intraespecífica e minimizando a hibridação interespecífica. GENTRY (1974) verificou que o gênero *Arrabidaea* (Bignoniaceae), na Costa Rica e no Panamá, floresce o ano todo, mas o pico do florescimento de seis espécies é distribuído pelos meses do ano: *A. molissima* tem o pico do florescimento em fevereiro; em *A. coralina* o máximo florescimento é atingido em abril; *A. pattelifera* o tem em julho; *A. florida* atinge o seu pico em agosto; em setembro, o florescimento máximo é atingido pela espécie *A. chicha* e, em dezembro, pela espécie *A. candicans*.

NASSAR (1980) estudou a hibridação de quatro espécies selvagens do gênero: *M. anomala* Pohl, *M. oligantha* Pax e emend. Nassar subsp. *nesteli*, *M. gracilis* Pax e *M. zehntneri* Ule) com *M. esculenta* 'Catelo'. Baseando-se na alta taxa de formação de sementes por flor polinizada nos cruzamentos das mandiocas com *M. oligantha* subsp. *nesteli*, além de se basear nos resultados bem sucedidos de hibridações de *M. melanobasis* com mandioca, obtidas por JENNINGS (1959) e, também, em cruzamentos com sucesso entre *M. glaziovii* e mandioca realizados por MAGOON et al. (1970), menciona a importância da hibridação no gênero, citando, inclusive, ROGERS & APPAN (1973) que argumentam que a hibridação deve ter tido um papel importante na especiação de *Manihot*, através da introgressão. Não contestamos a relevância da hibridação no gênero, mesmo porque, as barreiras de isolamento, como foi visto, não são absolutas, logo, o fluxo gênico não é impedido; mas julgamos importante alguns comentários sobre as idéias que têm sido difundidas em relação a essas hibridações :

(a) NASSAR (1980) cita, na obtenção dos seus resultados, que foi bem alta a taxa de sementes formadas no cruzamento de *M. oligantha* subsp. *nesteli* com o 'Catelo', mas não faz menção quanto à germinação das sementes. Então, surgem perguntas naturais a isso: as sementes foram testadas quanto à germinação? Caso testadas, germinaram? Esse é um aspecto muito importante, conforme obtido nos resultados do nosso trabalho, pois em muitos dos cruzamentos que fizemos, apesar de termos conseguido sementes, estas eram inviáveis pela própria aparência. JENNINGS (1963) menciona em seu trabalho que, nos resultados obtidos, o grau de relação entre os gametas não alterou a produção de sementes: os resultados obtidos entre parentais próximos foram semelhantes àqueles entre parentais distantemente relacionados. A única diferença na distinção de tais cruzamentos foi a baixa capacidade de germinação das sementes e a alta proporção de plântulas inviáveis produzidas pelas sementes que germinaram;

(b) Em um gênero dotado de tantas espécies, é difícil extrapolar-se os resultados de polinizações para todas as outras espécies, e nem mesmo pode-se considerar generaliza-

da para uma espécie, um determinado comportamento reprodutivo, sem fazer um teste mais amplo a nível de população. No caso de não se poder generalizar os resultados para outras espécies, o próprio NASSAR (1980) obteve em seu trabalho, taxas extremamente baixas de formação de sementes entre o 'Catelo' e *M. anomala*. Quanto à análise ter que ser mais abrangente em termos populacionais, podemos citar que MAGOON et al. (1970) obteve sucesso nas polinizações de *M. glaziovii* com mandioca, ao passo que KOCH (1934) apud NASSAR (1980), teve polinizações insuportadas no mesmo tipo de cruzamento feito por MAGOON et al. (1970). Isso denota bem que a amostragem populacional é muito importante e nos nossos resultados também tivemos esse tipo de problema, o qual será discutido mais adiante;

(c) NASSAR (1980) cita, em sua metodologia, que coletou estacas, plantas inteiras e sementes das espécies, e plantou para se obter as flores utilizadas nas polinizações. Quanto ao 'Catelo', o autor não mencionou se trabalhou com um clone ou com uma população formada por indivíduos de diferentes genótipos. Em um gênero de propagação vegetativa é difícil analisar os resultados de cruzamentos sem se conhecer a origem genética do material com o qual se está trabalhando, e esse foi um ponto de dificuldade em nosso trabalho, como será discutido posteriormente.

A facilidade do estabelecimento de híbridos intra e interespecíficos também foi enfatizada por ROGERS (1965) e por KAWANO et al. (1978), devido à protoginia acentuada e ao fato de os agentes polinizadores (geralmente abelhas e vespas), terem boa capacidade de vôo. Mas isso é uma citação que precisa de alguma cautela, uma vez que LEVIN (1979) diz que o tempo pode ser um fator limitante para as plantas polinizadas por abelhas, já que testes empíricos mostraram que, se as abelhas recebessem pólen para serem depositados no estigma de uma flor, mas antes ficassem confinadas por um certo tempo (12 a 24 horas) e depois liberadas para colocarem o pólen no estigma, tais grãos não germinariam. Isso sugere que o tempo de liberação do pólen até a sua deposição no estigma pode ser uma forma de isolamento entre as espécies.

Finalmente, JENNINGS (1959) argumenta em favor da facilidade de hibridação em *Manihot* devido aos cruzamentos bem sucedidos com alta taxa de fertilidade dos híbridos, quando polinizou *M. esculenta* e *M. melanobasis*, mas JENNINGS (1963) já se mostra mais cético quanto à grande facilidade de hibridação natural no gênero, ao mencionar que foi bastante reduzida a fertilidade de híbridos envolvendo *M. dichotoma*, havendo aí algum tipo de incompatibilidade interespecífica.

O isolamento temporal pode ser expresso na forma de periodicidade diurna no florescimento e liberação de pólen e produção de néctar. Em algumas espécies, a liberação do pólen é durante a manhã, ao meio dia, à tarde, ao anoitecer, ou o dia todo. Um dos casos mais extremos foi encontrado em espécies de *Cordia*, na Costa Rica, por OPLER et al. (1975) apud LEVIN (1978). O período de antese das flores para as espécies é o seguinte: *C. pringlei*, *C. curassavica* e *C. inermis*: 6 horas; *C. collococca* e *C. panamensis*: 9 horas; *C. gerascanthus*: 16 horas e 30 minutos, e de 19 horas até 5 horas da manhã seguinte, para *C. allidora*. O pólen geralmente é liberado poucas horas após a antese e a produção de néctar é também em função de determinados horários, como segue: nas espécies *C. curassavica*, *C. dentata*, *C. pringlei*, e em *C. inermis*, a produção de néctar se inicia às 6 horas, sendo que nas duas primeiras espécies essa liberação se estende por um período de 3 horas, e nas outras duas, por um período mais longo, por 6 horas. Às 9 horas se inicia a produção de néctar para as espécies *C. collococca* e *C. panamensis*, mas na primeira, esta liberação se prolonga por 3 horas e na segunda espécie, por 6 horas. Os períodos mais longos de liberação de néctar estão nas espécies *C. gerascanthus*, que inicia a produção às 16h30min e tem a secreção do néctar prolongada por 14 horas, e *C. allidora*, que inicia a liberação do néctar às 19 horas e estende essa produção por 10 horas. A maioria das espécies é polinizada por uma gama de espécies de Lepidoptera e Hymenoptera.

Para os cultivares de *M. esculenta*, 'Branca de Santa Catarina' e 'Taquari', o horário para a liberação do pólen é, respectivamente, entre 13 e 16 horas (Tabela 3) e 14 e 16 horas (Tabela 4) e para *M. pilosa* é entre 12 e 14 horas (Tabe-

la 2), o que contrasta com o comportamento essencialmente matutino da receptividade máxima do estigma (grau 2) da espécie *M. tripartita*, que fica entre 9 e 10 horas (Tabela 1). Diante dessas condições, torna-se mais ou menos evidente a dificuldade para a ocorrência de polinização natural entre *M. tripartita* e os cultivares de *M. esculenta* aqui considerados, e a espécie *M. pilosa*. A polinização artificial pode ser efetuada ao se depositar pólen no estigma ainda não receptivo de *M. tripartita*, no final da tarde para, no dia seguinte, ocorrer a fecundação, ou então, estocar pólen por uma noite, para durante o período da manhã, colocá-lo no estigma receptivo. Mas a eficácia dessas possibilidades é dúbia, principalmente por não haver, em mandioca, estudos concernentes ao tempo de estocagem do pólen. É bem verdade que, em muitos casos, o pólen é funcional antes da deiscência da antera e pode ser extraído das anteras fechadas para posterior uso (FRANKEL & GALUN, 1977), mas, em muitos casos, como o que ocorre em *Chrysanthemum morifolium*, a fertilidade do pólen pode diferir quando estocado ou a fresco; logo, um teste para determinar a sua qualidade seria útil (JONG & KHO, 1982). Não se pode garantir que a capacidade competitiva do pólen "velho" seja a mesma do "novo" (LEVIN, 1979). E, em mandioca, parece que o fato de se guardar botões masculinos, de um dia para o outro, em placa de Petri, conforme fizemos, não é um método muito favorável, pois os resultados da Tabela 9 nos mostram que para o único caso em que precisamos armazenar pólen, para a polinização de *M. tripartita*, não obtivemos frutos e nem sementes. Porém, quando as sementes eventualmente se formavam, eram inviáveis. Esta seria uma outra barreira temporal que podemos sugerir para o gênero estudado, e se mostra bastante efetiva, como pôde ser apreciado.

Embora estejamos cientes de que o nosso universo de trabalho é restrito, e que as observações de campo foram realizadas em uma amostragem pouco representativa, devido ao fato de termos trabalhado com um número pequeno de indivíduos dentro de cada espécie e cultivar, limitando a disponibilidade de genótipo, além de tais observações terem sido efetuadas em condições de cultivo e não da manutenção das espécies em habitat natural, fazendo-se uma observação mais minuciosa, como a citada, pode-se sugerir que há uma possível ocorrência de mecanismos exter-

nos de isolamento reprodutivo entre as espécies selvagens, ou entre estas e a espécie cultivada. Isto posto, podemos sugerir, segundo a classificação de GRANT (1971) ou de LEVIN (1978) quanto aos mecanismos de isolamento, que há, no gênero, um isolamento reprodutivo do tipo temporal incompleto, sendo da categoria sazonal em relação à época do florescimento, e sendo da categoria diária (i.e, diurna/noturna) em relação ao horário de receptividade floral. Entretanto, essa afirmação não pode ser categórica, uma vez que os mecanismos de isolamento não existem como propriedades de simples espécies ou simples populações. Por exemplo: uma translocação recíproca, ou uma cor particular da corola, não constituem, por si sô, mecanismos de isolamento. Elas se tornam importantes quando populações relacionadas diferem nesse aspecto (LEVIN, 1979).

A presença de patamares, quanto ao tempo de duração da receptividade do estigma para as flores femininas nas Figuras 1 e 2 (*M. pilosa* e *M. tripartita*, respectivamente), parece sugerir uma dependência maior das espécies à polinização que os cultivares, como se vê nas Figuras 3 e 4, em que os cultivares, ao invés de patamares, têm picos, cuja receptividade dos estigmas é ótima (grau 2). Talvez, sob as condições de cultivo, a mandioca tenha minimizado a necessidade da produção de sementes em favor da reprodução vegetativa, pois essa Euphorbiaceae sempre foi propagada vegetativamente com ótimo brotamento de estacas (GRANER, 1942a). Essa condição de que as espécies parecem ter mais necessidade de serem polinizadas do que os cultivares, parece não ser característica exclusiva da mandioca ou de plantas com reprodução vegetativa acentuada, pois situação análoga foi encontrada por GANESHAIAH & SHAAKER, (1982) ao estudarem *Eleusine coracana* (cultivada) e mais uma raça invasora dessa espécie e duas espécies selvagens desse gênero : *E. africana* e *E. indica*. Os autores verificaram que tanto a raça invasora como as espécies selvagens foram caracterizadas por uma prolongada fase reprodutiva e com todos os eventos do florescimento assincrônico e, em *E. coracana*, o florescimento foi abrupto e de curta duração, o que fez os autores sugerirem que durante a domesticação houve uma compressão temporal dos processos reprodutivos.

5.1.1. Cruzamentos Interespecíficos

Contrariamente às culturas de clima temperado, pouco se conhece sobre as polinizações em plantas tropicais (CHAPMAN, 1964). Apesar de haver cruzamentos bem sucedidos entre espécies selvagens de *Manihot*, como os obtidos por NASSAR (1978c), e entre espécies selvagens do gênero e a espécie cultivada, conforme registro de JENNINGS (1959), MAGOON et al. (1970) e NASSAR (1978b, 1980), as evidências que temos pelos nossos resultados, como já citado no item 5.1, e conforme vamos mencionar aqui, são sugestivas de barreiras interespecíficas em *Manihot*. Isso concorda com o mencionado por JENNINGS (1963), de que é bastante comum a existência de esterilidade na geração F_1 de híbridos interespecíficos no gênero considerado. Muitas vezes há produção de sementes, porém, estas não germinam ou, se germinam, a plântula perece. JENNINGS (1976) cita que todas as espécies podem ser intercruzadas, mas há evidências de que elas são reprodutivamente isoladas na natureza.

Nos resultados que obtivemos sobre o cruzamento interespecífico envolvendo a espécie *M. tripartita* como parental masculino, verificamos, pela Tabela 9, que a taxa de formação de sementes foi maior nas polinizações envolvendo a espécie *M. pilosa* do que os dois cultivares. Uma provável explicação para isso é que para se efetuar os cruzamentos com os cultivares, foi preciso estocar o pólen de *M. tripartita* e a viabilidade torna-se duvidosa, conforme já mencionado no item 5.1. Já nos cruzamentos envolvendo essa espécie e a *M. pilosa*, podemos observar pelas Figuras 1 e 2 que, quando há um máximo de flores masculinas abertas em *M. tripartita*, a receptividade do estigma de *M. pilosa* está aumentando (ao redor de 11 horas). Todas as sementes obtidas tinham uma aparência normal, mas não foram testadas quanto à sua capacidade de germinação, porque as sementes fungaram quando foram postas para germinar.

Quando *M. tripartita* foi testada como parental feminino, houve um grande insucesso na formação de sementes, quer em porcentagem, quer em viabilidade. Todas as sementes obtidas eram

inviáveis. Esse fato não poderia ser explicado pela ocorrência de barreiras externas de isolamento, uma vez que, pelas Figuras 1 e 2 podemos observar que o máximo de receptividade do estigma das flores femininas da espécie *M. tripartita* coincide com a máxima abertura das flores masculinas de *M. pilosa* (11 h). NASSAR (1978c) citou que possui dados não publicados que indicam que a fertilidade de cruzamentos de mandioca com a espécie *M. tripartita* é de 22%. Posto isto, podemos pensar na possibilidade de explicarmos esses nossos resultados através da existência de alguma barreira reprodutiva a nível pré-zigótico (pólen-pistilo), ou a nível pós-zigótico (sementes), conforme a classificação dos mecanismos de isolamento proposta por LEVIN (1978). JENNINGS (1963), analisando o resultado de cruzamentos envolvendo *M. glaziovii* e mandioca, e *M. dichotoma* e mandioca, mencionou que a baixa fertilidade das primeiras gerações deve ser decorrente de algum mecanismo de incompatibilidade interespecífica, agindo conjuntamente com os fatores limitantes da fertilidade herdados da mandioca. Se estudos mais amplos confirmarem isso, seria necessário reanalisar a posição da família Euphorbiaceae, na qual os registros de incompatibilidade são incipientes (GODLEY, 1955; WEBSTER, 1967).

Em termos de receptividade do estigma e liberação do pólen, *M. pilosa* (Figura 1) poderia ser usada como parental masculino e feminino, com os cruzamentos envolvendo 'Branca de Santa Catarina' (Figura 3) e 'Taquari' (Figura 4). Mas, pela Tabela 9, verificamos que esses cruzamentos não foram bem sucedidos, e isso pode ser explicado pela falta de coincidência na disponibilidade de flores entre a espécie em questão e os cultivares mencionados, como se observa na Figura 9, época na qual os cultivares começam a ter um incremento no florescimento, a espécie já se encontra em acentuado declínio na floração.

Pelo fato de os dois cultivares usados no presente estudo terem o mesmo comportamento de deiscência das flores, e o mesmo período de florescimento, esperar-se-ia um elevado índice de formação de sementes, mas essa taxa obtida por nós foi bastante baixa (1,4%), o que poderia ser explicado pelo fato de o 'Branca de Santa Catarina' estar muito atacado por bacteriose, o que prejudicou a formação de sementes, conforme consi

derou JENNINGS (1963), o sucesso na obtenção de sementes de mandioca depende das condições de adaptação e sanidade das plantas envolvidas. A bacteriose é facilmente visualizada, porque ela produz uma coloração escura nas folhas, que progride para o pecíolo e regiões jovens da planta; como é uma doença sistêmica, provoca uma exsudação de látex, o qual se torna oxidado quando exposto ao ambiente, adquirindo uma coloração amarronzada. Outro fator que poderia ser usado para explicar essa reduzida taxa de sementes formadas, seria a existência de incompatibilidade entre alguns cultivares, uma vez que PEREIRA et al. (1978), citaram que a taxa de fecundação cruzada entre o 'Branca de Santa Catarina' e o 'Vassourinha Paulista' situa-se entre 63 e 100%. Mais uma vez, deve ser mencionado que não conhecemos a origem do material que trabalhamos, e nada impede que outro clone de "Branca de Santa Catarina", com outra constituição genética, origine resultados diferentes destes.

5.2. Sistemas Reprodutivos

Os poucos estudos de biologia da reprodução feitos nas espécies distribuídas no gênero *Euphorbia*, têm demonstrado uma ampla variedade de sistemas sexuais, indo de alogamia obrigatória, em *E. cyparissias*, conforme citação de MEUNSHER (1936) apud EHRENFELD (1976), até apomixia do tipo embrionia adventícia, em *E. dulcis*, segundo constatação de CARANO (1926) apud EHRENFELD (1976). Em mandioca, até o presente, foram relatados dois tipos de reprodução: a sexual e a assexual, do tipo propagação vegetativa (ROGERS, 1965). Quando investigamos a outra categoria de reprodução assexuada, a agamospermia, conforme classificação de GUSTAFSSON (1946), verificamos que, pelo menos nas plantas utilizadas neste estudo, a agamospermia ocorre em índices praticamente irrelevantes. Além de não termos encontrado al terações comprobatórias quando do exame histológico dos ovários, também contamos com a hipótese da contaminação em campo, apesar das cautelas tomadas. Posto isso, é bom estarmos atentos, principalmente em investigações futuras, quanto ao fato de, na ausência de polinização, apenas o 'Branca de Santa Catarina' apre sentar sementes totalmente formadas (1,0% no florescimento refe

rente a 1980, e 1,5% no florescimento referente a 1983/1984 - Tabela 10. Essas sementes germinaram, mas as plântulas não sobreviveram, quando transplantadas.

Pela Tabela 10, que reflete os resultados sobre agamospermia, podemos observar que, na ausência de polinização, foi grande a tendência para a formação de ovários desenvolvidos, o que não se encontra na Tabela 9, que mostra as taxas de frutos formados mediante a polinização. Isso sugere que o pólen desempenha um papel fundamental para o desenvolvimento de frutos em *Manihot*. BAWA & WEBB (1983) observaram em *Muntingia calabura*, que as espécies autocompatíveis, polinizadas por abelhas, são altamente dependentes do pólen, pois as flores que não recebem pólen, caem 1 ou 2 dias após a antese, com um único caso de apenas duas flores terem desenvolvido fruto, por quatro semanas, e depois caírem.

Também detectamos a ocorrência de partenocarpia, a qual é definida por WINKLER (1908) apud GUSTAFSON (1942) como o fenômeno pelo qual há produção de frutos sem sementes, ou com sementes vazias.

Dadas as limitações deste estudo, não foi possível chegar a conclusões sobre a partenocarpia, mas algumas sugestões para uma investigação futura poderiam ser colocadas. Parece que os cultivares têm maior tendência ao fenômeno (23,3% de frutos no 'Taquari' e 8,9% de frutos no 'Branca de Santa Catarina' - Tabela 11). Então, podemos pensar que, com o cultivo, houve uma seleção indireta de genes condicionadores da partenocarpia.

Um início para a investigação mais precisa da partenocarpia em mandioca, poderia ser observada se a tendência para a formação dos frutos está ou não relacionada com a ramificação. É mais ou menos comum haver diferenças no tipo de reprodução, ou diferenciação sexual, em relação ao estrato da planta. Em plantas de tomates trissômicos, por exemplo, LESLEY & LESLEY (1941) detectaram que os frutos basais tinham tendência à partenocarpia, enquanto os frutos provenientes de inflorescências atrasadas no florescimento, eram mais prováveis de

possuir frutos com sementes. Os frutos apicais eram, de modo geral, portadores de sementes. Em pepino, a partenocarpia é condicionada por um gene (P) de dominância incompleta. Na condição homozigota (PP), a produção de frutos partenocárpicos ocorre cedo, com os primeiros frutos, desenvolvendo-se geralmente no quinto nó. As plantas heterozigotas (Pp) produzem frutos partenocárpicos mais tardiamente e em menor número que as plantas (PP). Os homozigotos recessivos (pp) não produzem frutos partenocárpicos (PIKE & PETERSON, 1969). BAWA & WEBB (1983) constataram que em *Muntingia calabura*, a diferenciação sexual se dá ao tempo da abertura das flores nos fascículos. Assim, as flores que primeiro se abrem nos fascículos têm ovários desenvolvidos e poucos estames; à medida que as últimas flores se abrem nos fascículos, essa situação se inverte, havendo predomínio de maior número de estames e redução no tamanho dos ovários.

Caso seja mais comum a ocorrência de frutos partenocárpicos nas primeiras ramificações, isto poderia estar relacionado com aspectos nutricionais; os frutos que se localizam em posição mais baixa nos ramos, poderiam ter facilitada a translocação de substâncias de crescimento, ou poderia ser aventada a hipótese de que as primeiras ramificações são, evidentemente, sinônimo de início de florescimento; logo, haveria maior disponibilidade de reservas na planta para promover o desenvolvimento de tais frutos.

O efeito da poda ou não das plantas também pode ser indutor de partenocarpia, segundo a classificação de GUSTAFSON (1942). MONTEIRO et al. (1984) verificaram que plantas não podadas, de nove variedades de mandioca, produziam maior quantidade de sementes chochas (37,8%) do que as plantas dos demais tratamentos (22,0%). Os autores explicaram que a alta porcentagem de sementes chochas produzidas em todos os tratamentos deve ter sido causada por geadas que ocorreram no final do período de florescimento e frutificação, na cidade de Tietê (SP), onde o experimento foi conduzido, mas mencionaram ainda que a alta taxa de sementes chochas nas plantas não podadas, sugere um efeito adicional de tratamento, ou seja, a poda foi um fator relevante.

GUSTAFSON (1938) propôs a hipótese de que as plantas que produzem frutos partenocárpicos possuem, no estágio de botão, auxinas suficientes para começar o crescimento do ovário sem fertilização. Talvez fosse interessante desenvolver, na medida do possível, um bioteste para medir a concentração de substâncias de crescimento, para determinar quais cultivares ou espécies selvagens teriam uma maior concentração dessas substâncias que promoveriam a partenocarpia. Foi com um experimento desse tipo que GUSTAFSON (1939) utilizou o teste de *Avena*, para determinar a concentração de auxinas nos botões femininos de laranja e limão que leva ao desenvolvimento de frutos partenocárpicos. Embora remoto, pelo fato de não termos obtido frutos nas inflorescências emasculadas da espécie *M. tripartita* (Tabela 10), poderia ser questionado se a emasculação das inflorescências não estaria induzindo a partenocarpia em mandioca. Uma vez retiradas as flores masculinas, haveria um maior acúmulo de substâncias nutricionais ou hormonais à disposição dos botões femininos, para o seu desenvolvimento.

Como a partenocarpia, segundo GUSTAFSSON (1946), é uma categoria de apomixia, não podemos deixar de lembrar que a apomixia é muito dependente das condições ambientais, e o florescimento em mandioca tem uma correlação muito forte com as condições edafo-climáticas. Quando o solo é muito fértil, o porte vegetativo da planta torna-se exuberante. o florescimento é muito reduzido, e grande parte dos frutos caem antes de amadurecer. Em solos pobres, o florescimento é intenso. Então, é cabível sugerir que a partenocarpia tenha uma maior manifestação quando as plantas se encontram em solos pobres. Experimentalmente, poder-se-ia verificar isso fornecendo condições de "stress" ao terreno.

Dentre as diversas citações da interação ou inter-relação dos fatores ambientais com a apomixia, foi sugerido por GRAZI et al. (1961) que em *Poa pratensis* pode existir um balanço bastante delicado entre sacos embrionários apospóricos e sexuais, e que o ambiente pode promover um balanço em favor de um ou de outro. Foi também verificado por KNOX (1967), que o fotoperíodo afeta a frequência de progênies aberrantes dos apotímicos facultativos de *Dichanthium aristatum*.

5.2.1. Cruzamentos Intraespecíficos

O sucesso na produção de sementes nas autopolinizações foi baixo (Tabela 9), mas o caso que mais desperta a atenção é o da autofecundação na espécie *M. tripartita*, em que todas as sementes obtidas eram chochas. As sementes obtidas nas autopolinizações de *M. pilosa* e de 'Taquari' tinham aparência normal, mas não foram testadas quanto à germinação. Pelos dados das polinizações cruzadas envolvendo *M. tripartita* como parental feminino e, pelos resultados da autofecundação, tornam-se mais fortes os indícios de incompatibilidade. Mas, enquanto não se aumentar a abrangência dos estudos, a autoincompatibilidade em *M. tripartita* permanece no terreno das hipóteses. Principalmente, porque é impossível discutir incompatibilidade se não se conhecer a origem genética do material, uma vez que essa incompatibilidade pode ser governada por alelos múltiplos, e esses ocorrem ao acaso na população. Poderia ser, então, o caso de estarmos, casualmente, trabalhando com um indivíduo que possuísse esses alelos.

Devemos levar em conta outras explicações, também, como a que GIBBS et al. (1975) forneceram para explicar a baixa taxa de produção de sementes quando da autofecundação de duas espécies de *Senecio* (*S. viscosus* e *S. vulgaris*), que são autógamas. Isso não significa que a autogamia não ocorreu, mas é o reflexo das condições naturais em que se encontram.

Para se ter uma visão mais real do papel da autogamia no gênero *Manihot*, seria interessante comparar-se a taxa de germinação das sementes oriundas da autofecundação cruzada e não se deter apenas na taxa da produção de frutos e/ou sementes. Essa análise de germinação evitaria, por exemplo, casos em que tivéssemos situações contraditórias, como apresentado no diagrama de cruzamentos. Por esse diagrama, temos uma aparente tendência de cruzamento entre *M. pilosa* e *M. tripartita*, por apresentar produção de sementes, conforme mostra a Tabela 9, mas as sementes são chochas, logo, não há fluxo gênico entre essas espécies. NICHOLS (1947) apud JENNINGS (1963) usou a por

centagem de sucesso de cruzamentos no gênero *Manihot* como sendo a porcentagem de plantas maduras e viáveis oriundas de cruzamentos interespecíficos.

5.3. Citologia e Embriologia

5.3.1. Microsporogênese

Um dos maiores problemas para o estudo da microsporogênese foi o fato dos botões masculinos terem graus diferentes de maturação em uma mesma inflorescência e, também, devido ao fato de esses botões atingirem a maturidades das anteras com um tamanho relativamente pequeno; logo, o tamanho dos botões masculinos, por si só, não é um indicativo para se encontrar anteras no estágio de microsporogênese.

As dez anteras do gênero *Manihot* são dispostas em dois verticilos (5 no verticilo superior e 5 no verticilo inferior) e pela Figura 10, que indica o corte transversal de um botão jovem, visualizamos cinco dessas anteras, e um dos indicativos do estado bem inicial do desenvolvimento é a presença de septos de células parenquimáticas entre os quatro microsporângios, conforme o indicado pela seta. Na maturidade, esses septos se degeneram, como pode ser visualizado na Figura 20, tornando os dois microsporângios de cada lado confluentes. Segundo MAHESHWARI (1950), esta é uma antera típica. Conforme DAVIS (1966), apenas em 218 famílias se tem registro sobre o número de microsporângios que compreendem as anteras, sendo que a condição mais comum é a tetrasporangiada.

A presença de uma única fileira de células-mãe do micrôsporo, em cada microsporângio, com uma cromatina pouco conspícua, em termos de coloração, e um nucléolo bastante colorido, concorda com as investigações de GRANER (1935) e SOHMER (1968) sobre a microsporogênese de *M. esculenta*.

As gotículas brilhantes que ocorrem no citoplasma

das células dos botões masculinos em que se acompanhou a microsporangênese, são de amido, uma vez que essa planta é um grande reservatório desse material. BAKER & BAKER (1979) disseram que é possível separar os grãos de pólen em dois grandes grupos: com amido e desprovido de amido. MAHESHWARI (1950) afirma que nos grãos de pólen jovens, a reserva de alimento é de gotas de gordura, e a formação de amido se inicia depois de os grãos terem aumentado de tamanho.

Outra dificuldade para o acompanhamento da meiose é que ela parece ser um processo relativamente rápido, haja visto o pequeno número de células conseguidas em divisão (Tabela 12), apesar de se ter buscado isso em milhares de botões. GRANER (1935) faz menção em particular à diacinese que, segundo esse autor, parece ser uma etapa da *M. esculenta* bastante rápida, sugerindo assim, a brevidade desse estágio de prófase. Os resultados da Tabela 12 podem ser usados para ilustrar essa citação de GRANER (1935), pois o maior número de células em divisão que conseguimos, estavam no estágio de paquíteno (45 células para o 'Branca de Santa Catarina', 19 células para o 'Taquari', 39 células para *M. tripartita* e 4 células para *M. pilosa* e, em metafase I (32 células para o 'Branca de Santa Catarina', 30 células para o 'Taquari', 11 células para *M. tripartita* e 1 célula para *M. pilosa*). Analisando os resultados da Tabela 12, pode-se, à primeira vista, ter a impressão de que há uma maior dificuldade para se obter células em meiose nos cultivares do que nas espécies, pelo fato de haver um número maior de registros dessas células para os cultivares do que para as espécies com as quais trabalhamos. Mas, deve-se ressaltar que para as observações referentes à citologia, foi utilizado um maior número de botões masculinos dos cultivares, para preparo das lâminas, por termos maior disponibilidade de plantas. Há, ainda, em termos de dificuldades para se conseguir boas preparações de lâminas com células em meiose, o espalhamento difícil dos cromossomos (GRANER, 1935).

Embora em alguns poucos cultivares de mandioca haja irregularidades meióticas, como "laggards", não separação de bivalentes, núcleos de restituição, poliades, etc., é mais comum a ocorrência de meiose normal (GRANER, 1935; CRUZ, 1968; SOHMER

1968; MAGOON et al, 1969; NASSAR, 1980).

O resultado que encontramos, a respeito de ser a divisão da célula-mãe do micrósporo do tipo simultâneo (Figura 18), concorda com o citado SOHMER (1968), quando investigou a citologia de cultivares de *M. esculenta*. Embora haja excessões, o tipo simultâneo de divisão é o que prevalece nas dicotiledôneas e parece ser o mais primitivo (MAHESHWARI, 1950; DAVIS, 1966). Quanto ao arranjo das tétrades de megásporos ser do tipo tetraédrico, está de acordo com o observado por SOHMER (1968) e esse é o tipo mais comum encontrado nas dicotiledôneas (MAHESHWARI, 1950; DAVIS, 1966).

A esterilidade masculina pode ser causada, ou pela falta da produção de pólen, ou pela produção de pólen inviável (JAKUBIEC, 1973; CARROL, 1975; CARROL & LOW, 1976). Uma série de eventos pode ocorrer em qualquer etapa do estágio pré-meiótico através da produção de grãos de pólen aparentemente normais, mas inviáveis. Distúrbios pré-meióticos, meióticos ou pós-meióticos podem ser responsáveis pela macho-esterilidade (CHUWDHURY & DAS, 1968).

Em mandioca, com aproximadamente 4.000 anos de propagação vegetativa, tem havido, sem dúvida, durante o cultivo dessa Euphorbiaceae, o acúmulo de mutações espontâneas, que tem afetado a fertilidade do pólen, do óvulo e das sementes (JEN-NINGS, 1963; SOHMER, 1968). Isso leva a uma seleção indireta para a esterilidade. Até o momento, foram registradas quatro causas de esterilidade masculina em mandioca: não disjunção dos micrósporos, comportamento anormal do tapete da antera, comportamento anormal do endotécio, e anomalias citológicas (MAGOON et al., 1968; JOS & BAI, 1981). A esterilidade masculina do 'Branca de Santa Catarina', está relacionada com o comportamento anormal do tapete da antera; é, então, um fator pós-meiótico. Conforme as Figuras 25 e 26, as células do tapete da antera sofrem divisões contínuas, ao invés de degenerarem, como é o caso usual nas plantas. Isso faz com que as células-mãe do pólen fiquem sem nutrição e, com isso, degenerem. (CHILDERS, 1952; CHILDERS & McLENNAN, 1960 apud CHUWDHURY & DAS, 1968).

CHILDERS (1952), CHILDERS & McLENNAN (1960) apud CHUWDHURY & DAS (1968) mencionaram que mudanças no desenvolvimento das células do tapete promovem a degeneração das tétrades. Em *Brassica campestris* L. CHUWDHURY & DAS (loc. cit.) verificaram que, no final do estágio pós-meiótico, o desenvolvimento das células do tapete começou a ser anormal para as plantas com esterilidade masculina (tais células não se degeneram), enquanto que para as plantas férteis, essas células sofreram o processo de degeneração. Fato semelhante foi observado por SINGH & RHOADES (1961) apud CHUWDHURY & DAS (1968) em *Cucurbita maxima* Duchesne e em *Shorghum* Moench. por SINGH & HADLEY (1961) apud CHUWDHURY & DAS (1968).

JOS & BAI (1981) dizem que um clone tetraplóide de mandioca, foi observado, a despeito da meiose regular e da disjunção normal dos micrôsporos, que não havia a deiscência das anteras e, portanto, os grãos de pólen eram liberados. Nesse clone, a falha da deiscência das anteras é atribuída à ausência de espessamento do endotécio, que permanece com o aspecto parenquimatoso. Isso também foi encontrado no 'Branca de Santa Catarina', como pode ser visto na Figura 24.

A taxa de 4,7% de irregularidades na divisão das células-mãe do micrôsporo, pode ser decorrente da esterilidade do 'Branca de Santa Catarina'. Segundo SWANSON (1965), os números atípicos de micrôsporos produzidos após a divisão da célula-mãe dos micrôsporos, são devidos à falha de uma divisão ou formação de uma parede irregular. Essa anomalia geralmente é encontrada em híbridos caracterizados por um alto grau de esterilidade. Outro fator que pode ser reflexo da esterilidade é a "viscosidade" da cromatina e o assincronismo de fases no 'Branca de Santa Catarina', embora não tenhamos encontrado, na literatura, referências a esse respeito.

A citomixia é mais freqüente na sinesesis e em diacinese (MAHESHWARI, 1950). A alta porcentagem nos cultivares - (60% em 'Branca de Santa Catarina' e 79% no 'Taquari'), no estágio de paquíteno, talvez seja devida à alta hibridação intervarietal a que são submetidos os cultivares, pois MAHESHWARI (1950) cita isso como comum nos híbridos. É interessante o fa-

to de os autores que trabalham com citologia em *M. esculenta*, não fazerem menção ao fenômeno, principalmente por ocorrer em uma frequência que desperta a atenção. Apesar de WOODWORTH (1931) apud MAHESHWARI (1950) citar que a citomixia aumenta devido à pressão que se coloca nas lâminas preparadas pelo método de esmagamento, detectamos o fenômeno mesmo em lâminas que não foram pressionadas, com o propósito único de verificar se essa elevada frequência de citomixia era causada pela forte pressão aplicada na lâmina para se conseguir um melhor espalhamento dos cromossomos, ou se era inerente aos cultivares estudados.

STEBBINS (1970) apud GANESHAIAH & SHAKER (1982) assinalou que as mudanças no comportamento reprodutivo vêm a ser decorrência de alterações morfológicas e comportamentais da flor e da biologia floral. A maioria dos trabalhos que tratam desses aspectos, preocupa-se com modificações grosseiras, como diminuição no tamanho da flor, tamanho da antera, dormência de sementes, entre outras, esquecendo-se da ação de mecanismos mais sutis, como transferência de pólen disponível para a fecundação, etc.

Apesar do uso frequente do tamanho dos grãos de pólen como caráter taxonômico, ou como indicador de poliploidia, existem exceções registradas, como a citada por KUPRIJNOV (1940) apud BELL (1959), que detectou variações no tamanho do pólen de flor para flor, ou mesmo de antera para antera, e em plantas de tomate, melancia, trigo, cenoura e girassol. Pelas Figuras 27, 28, 29 e 30, verifica-se que o tamanho médio aproximado de grãos de pólen é próximo para as espécies *M. tripartita*, *M. pilosa* e para 'Branca de Santa Catarina', tamanho esse que é, em geral, ao redor de 155 μm . Grãos de pólen dessa faixa de tamanho, foram considerados como grandes, por WODEHOUSE (1935) e, conforme GRANER (1935), em mandioca, o grão de pólen atinge um tamanho bastante grande, sendo observado por SCHÜRHOFF (1924) apud GRANER (1935), que o tamanho dos grãos de pólen em mandioca desperta a atenção. Alguns extremos encontrados, como por exemplo, para a espécie *M. pilosa*, com 40 μm deixam dúvidas quanto à sua fertilidade; embora tenham sido coloridos com o carmim acético, não se pode garantir que sejam

fêrteis. Devido a esses extremos é que se encontrou um alto coeficiente de variação (Tabela 14). O tipo de solo não pode ter exercido alguma influência no diâmetro do pólen. BELL (1959) descobriu que a capacidade de estoque e translocação de nutrientes aumentaria a importância da nutrição mineral em relação ao tamanho do pólen em plantas anuais e diminuiria a sua importância em plantas de grande porte e perenes.

Mereceria investigação o diâmetro de grãos de pólen em outros cultivares, ou mesmo espécies, para verificar se há mais casos discrepantes como o do 'Taquari', que tem um tamanho médio de grãos em torno de 210 μm e tentar correlacionar isso com a capacidade de fecundação. Pois, pela Tabela 9, os cruzamentos envolvendo 'Taquari' como parental masculino, a despeito do horário de receptividade do estigma da espécie, ou cultivar usado como parental feminino, foram bem sucedidas, e OVCINNIKOV (1953) apud BELL (1959) encontrou uma correlação positiva entre o tamanho de pólen em trigo e a maior capacidade de fertilização.

Através da média de grãos de pólen necessária para fertilizar um óvulo em uma inflorescência, verifica-se, segundo CRUDEN (1977), que as proporções observadas são consistentes com um sistema de alogamia, tanto para os cultivares como para a espécie *M. pilosa*. Para *M. tripartita*, a proporção pólen:óvulo é muito maior (1943:91), sugerindo um sistema de polinização do tipo alogamia obrigatória, segundo limites estabelecidos por CRUDEN (1977). Aqui, contudo, deve ser feita uma ressalva quanto a esse método de Cruden: segundo esse autor, esse tipo de estimativa leva em consideração o número médio de flores masculinas e femininas por inflorescência e, conforme já foi discutido, a média dessas flores está sujeita à influência de vários fatores não controláveis. Assim, é bom, neste caso, levar em consideração os dados obtidos nas polinizações, como fonte mais segura para as discussões quanto ao tipo de cruzamento — o que pode ser confirmado com as polinizações pelo fato de as sementes oriundas de autopolinização serem chochas.

Em *M. tripartita*, a maior proporção de grãos de pólen por óvulo (1644 - Tabela 16), aliada à maior média de grãos

por antera (48 - Tabela 15) e à não formação de frutos quanto ao tratamento sem polinização (Tabela 11), sugere a forte dependência dessa espécie ao pólen. Isso nos indica que mais atenção deveria ser dispensada a essa espécie. ROGERS & APPAN (1973) dizem que esta é uma espécie complexa e as atenções a elas são dispensadas somente aos caracteres vegetativos e pouco aos caracteres reprodutivos.

Pela Figura 1 podemos observar que o óvulo em *Manihot* é do tipo anátropo. Segundo GRANER (1935), o óvulo desse gênero surge como uma protuberância ereta e arredondada, levantando-se da placenta. Nessa protuberância, o crescimento mais rápido de um dos lados faz com que o óvulo, que era ortótropo na sua fase mais inicial, de torne logo anátropo. Esse tipo de óvulo é caracterizado pela proximidade da micrópila com o hilo, decorrente de um crescimento unilateral. O óvulo anátropo é uma forma quase universal de ocorrência nas Simpetalae, mas ocorre também em muitas famílias de dicotiledôneas e monocotiledôneas (MAHESHWARI, 1950) e, segundo DAVIS (1966), em 315 famílias em que foi investigada a morfologia do óvulo, 204 apresentaram o tipo anátropo.

5.3.2. Megasporogênese e Megagametogênese

Os óvulos podem ser unitégminos ou bitégminos, sendo que as polipetalae e monocotiledôneas, via de regra, possuem óvulos com dois integumentos, fato que, em termos filogenéticos, é tido como primitivo (MAHESHWARI, 1950). Pela Figura 1, verificamos que o óvulo em *Manihot* possui dois integumentos, sendo que o externo tem um crescimento bem maior em relação ao interno, condição já relatada para outras espécies de Euphorbiaceae, como *Euphorbia rothiana* Spreng. (SRIVASTAVA, 1952) e como *Ricinus communis* L. (SINGH, 1964). Segundo MAHESHWARI (1950), a diferenciação do integumento interno ocorre antes do externo, mas o crescimento desse último sobrepõe-se ao do primeiro.

Embora rara, a micrópila pode ser constituída ape-

nas pelo integumento externo, como é o caso em Euphorbiaceae , Podostemonaceae e Rhamnaceae (MAHESHWARI, 1950). Em nosso caso, parece que estamos diante de uma exceção, pois a micrôpila em *Manihot* é constituída por ambos os integumentos, o que foi encontrado em *Ricinus comunis* por SINGH (1964).

A impressão que temos pela Figura 10 é que o nucelo se extravasa constituindo o obturador. Segundo GRANER (1935), à medida que o nucelo começa a desenvolver-se, da mesma placenta cresce outra intumescência, do lado oposto ao que dá origem ao nucelo, que é o tecido obturador, característico da Euphorbiaceae. Esse tecido cresce em direção ao óvulo, passando a manter uma estreita ligação com o nucelo. O obturador é uma estrutura formada como que por um engrossamento da placenta que cresce em direção à micrôpila, encaixando-se como um capuz sobre o nucelo. O obturador também pode ser formado de várias partes do pistilo. No nosso caso, não pudemos acompanhar as etapas iniciais do desenvolvimento. KAPIL (1956, 1958) apud MAHESHWARI (1950) registrou dois tipos de obturador nas Euphorbiaceae: (a) células pequenas de parede fina e compactamente arranjadas; (b) células frouxamente unidas, alongadas e semelhantes a pelos. Em *Manihot*, o obturador se encaixa no primeiro tipo descrito por Kapil. Essa estrutura, desprovida de vascularização, age como uma ponte para o tubo polínico (MAHESHWARI, 1950; GRANER, 1935).

D'AMATO (1939) apud MAHESHWARI (1950) citou quatro padrões distintos para o desenvolvimento do saco embrionário das Euphorbiaceae, sendo que o mais comum é o tipo monospórico oito-nucleado. Pela Figura 37, apenas um dos megásporos da tetrade linear mostra-se funcional. Conforme SRIVASTAVA (1952) , toda Euphorbiaceae monospórica possui uma tetrade linear de megásporos. É assinalado por MAHESHWARI (1948, 1950) que a formação desse tipo de tetrade é decorrente de duas divisões transversais da célula-mãe do megásporo. Na Figura 37, também pode ser visto que é o megásporo calazal que se torna funcionante , o que é quase uma regra (MAHESHWARI, 1950). Isto está de acordo com o encontrado no gênero em estudo, por GIOELLI (1933) e por SCHÜRHOFF (1924) apud GRANER (1935), em *Manihot dichotoma*.

Depois do megásporo passar por três divisões mitô-

ticas, o gametófito se torna oito-nucleado. No início da embriologia, esse padrão de desenvolvimento do gametófito feminino foi chamado de "Tipo Normal". Com o progredir dos estudos, verificou-se que outros tipos de desenvolvimento não eram tão incomuns quanto pareciam. Isso levou MAHESHWARI (1948) a denominar o então "Tipo Normal" de "Tipo *Polygonum*", porque foi em *Polygonum divaricatum* que STRASBURGER (1879) apud MAHESHWARI (1948), demonstrou, pela primeira vez, a ocorrência desse tipo de desenvolvimento do saco embrionário. MAHESHWARI (1948) considera esse tipo o mais primitivo ou, provavelmente, o mais fundamental que existe. A explicação para essa hipótese é que os outros padrões podem, freqüentemente, derivar do "Tipo *Polygonum*", enquanto a condição reversa não ocorre.

Levando-se em conta o número de óvulos estudados (Tabela 17), pode-se supor que a megasporogênese seja um processo relativamente rápido, devido a dificuldade em se encontrar óvulos passando pelo processo. Mas haveria necessidade de investigar se essa brevidade é característica de todas as espécies e cultivares, porque MEDINA (1960) constatou que em *Coffea dewevrei* De Wild. et Th. Dur. os estágios iniciais da megasporogênese são bastante longos, enquanto que em *C. arabica* L., o processo é mais rápido. Haja visto que, por ocasião da abertura da flor, o saco embrionário já se encontra totalmente formado. Na espécie *C. canephora* Pierre ex Froehner, a condição de desenvolvimento do gametófito feminino é intermediária à *C. dewevrei* e *C. arabica*.

GRANER (1935) e GIOELLI (1933) não encontraram anormalidades no desenvolvimento do gametófito feminino de *M. esculenta*; também não foram encontrados desvios em *M. dichotoma*, quando estudada por SCHÜRHOFF (1924) apud GIOELLI (1933). Nossos resultados também estão dentro do esperado. Parece que a etapa inicial da megagametogênese, ou seja, o estágio de dois núcleos, também é um processo breve, segundo os dados da Tabela 17. A migração dos dois núcleos para os polos é explicada por SRIVASTAVA (1952) como decorrente da coalescência de vários vacúolos; com isso, o saco embrionário se torna ocupado por um grande vacúolo.

O que mais poderia chamar a atenção na análise dos

resultados da Tabela 17, é a ocorrência de gametófitos atípicos com 3 e 5 núcleos, e algumas considerações merecem ser feitas. A mais provável é a de ser um artefato de técnica, pois algum núcleo poderia estar próximo à parede do saco embrionário e ser comprimido junto à parede no momento do corte, e isto impediria que ele fosse reconhecido. Outra explicação seria referente à própria planta: existe a possibilidade de os dois núcleos não se dividirem sincronicamente, com um núcleo dividindo-se mais tarde que o outro. Isso poderia ser confirmado, ou descartado, com o estudo de botões de tamanho grande, nos quais verificaríamos a frequência de sacos embrionários com oito núcleos, pois, se os dois núcleos se dividirem, mesmo que assincronicamente, o resultado final do processo será gametófitos oito-nucleados. Por fim, uma outra explicação será a ocorrência realmente de sacos embrionários com um número reduzido de núcleos, pela falta de divisão de um dos núcleos (micropilar ou calazal). A ocorrência de gametófitos femininos com número de núcleos reduzidos por falta de divisão, foi constatada em algumas espécies de *Phajus*, *Coralorrhiza* e *Broughtonia* (MAHESHWARI, 1950). MODILEWSKY & DESSIA TOFF, citados por DONATI (1913) apud GRANER (1935), encontraram nas espécies *Euphorbia procera* Bieb., *E. palustris* L. e *E. virgata* Waldst. & K.I.T., sacos embrionários com oito e dezesseis núcleos (GRANER, 1935).

Um fator que prejudicou bastante as observações histológicas do ovário, foi a ocorrência de substância acumulada no saco embrionário e no nucelo, conforme se vê na Figura 45. O indício de que esse material era amido foi fornecido pelo teste do material com luz polarizada. Esse teste indicou que a substância em questão era um cristal, pois desviava o plano da luz, conforme observamos na Figura 21. Quando a amido está organizado em grãos, ele se torna opticamente anisotrópico e pode ser caracterizado sob a luz polarizada (FAHN, 1974). Antes desse teste, tínhamos já uma certa convicção de que essa substância era amido; para isso, baseávamo-nos nos seguintes pontos: (a) o amido é a principal substância de reserva no gênero em questão; (b) SCHÜRHOFF (1924) apud GRANER (1935) citou que o obturador é muito rico em amido, o qual chega até a região onde se encontra o saco embrionário; (c) devido ao tratamento intenso do material em xilol e em álcool absoluto, dificilmente haveria a possibilidade de a substância acumulada ser um lipídeo, pois, se o fosse,

teria se dissolvido no xilol ou no álcool absoluto. O tratamento com iodina foi bastante eficiente e dissipa qualquer dúvida que possa restar sobre o fato. Talvez o teste com lugol não tenha sido satisfatório, pois esse corante é mais eficiente no estudo de material a fresco. Muitos autores relataram a grande dificuldade em se estudar os núcleos nos sacos embrionários de *Arachis* L., *Tilia* (Tourn.) L. e *Acacia* (Tourn.) L., devido à sua ocupação quase total pelo amido. Apesar disso, não é muito comum a citação de substância de reserva acumulada no caso embrionário e, se os pesquisadores fizessem um teste com iodina nos gametófitos das espécies com que trabalham, certamente haveria mais citações sobre a ocorrência de amido nos sacos embrionários das angiospermas (MAHESHWARI, 1950). Talvez, em *Manihot*, poderíamos ter o problema do acúmulo de amido minimizado, se vários dias antes da coleta protegêssemos os botões femininos com sacos pretos; assim, com a ausência de luz, o amido seria degradado. Deve ser lembrado que o acúmulo de amido tem muita dependência das condições ambientais e também é muito variável com a planta em questão e com o desenvolvimento do saco embrionário (MAHESHWARI, 1950).

Para tentar agilizar os trabalhos, lentos devido à morosidade da confecção de lâminas histológicas, e para se tentar visualizar os núcleos de maneira intacta, a fim de se constatar se há realmente sacos embrionários com números outros de núcleo que não oito, como é visto na Tabela 17, tentou-se confeccionar lâminas pelo método de clarificação. Infelizmente, as técnicas existentes adequadas para determinados gêneros não deram bom resultado para *Manihot*: para este gênero, a técnica terá que ser totalmente readequada, o que também dispense tempo. Segundo HERR (1971), em muitos gêneros a técnica precisa ser totalmente modificada, quando o método padrão não dá resultado.

É interessante a citação de HERR (1971) de que as primeiras investigações sobre a morfologia do gametófito nas angiospermas começou no início do século XIX, o que precedeu o desenvolvimento do micrótomo; assim, as preparações eram todas feitas em secções à mão livre e em preparação de clarificação. Diante disso, esperar-se-ia que a técnica de clarificação já

estivesse mais desenvolvida; porém, os investigadores que bem faziam uso dessa técnica, como Schleiden, Schacht e Hofmeister, omitiram de seus trabalhos as referências precisas para as técnicas específicas de clarificação. Dessa forma, os métodos empregados permaneceram apenas no terreno das conjecturas. As dificuldades quanto às técnicas histológicas também foram discutidas por PRAKASH (1979).

A informação exata sobre o tempo que leva o pólen para germinar sobre o estigma, é conhecido somente em algumas plantas: esse tempo é variável de espécie para espécie (MAHESHWARI, 1950). GRANER (1935) não estudou o desenvolvimento dos tubos polínicos no ovário de *Manihot*. Apesar de os resultados não serem satisfatórios quanto à coloração, deve ser lembrado que a técnica dá resultados bastante variáveis, dependendo do material. Foi possível verificar em 'Taquari', que havia grãos de pólen germinados após 6 horas de polinização, o que indica que, provavelmente, a germinação do pólen ocorre entre um período de 4-6 horas. Não foi possível verificar, em nenhum dos períodos de coleta após a polinização, o crescimento do tubo polínico para dentro do ovário. Algumas ressalvas devem ser feitas quanto a esse fato. Um primeiro ponto a ser levantado é quanto ao pequeno número de ovários examinados para cada tratamento: aproximadamente 6 a 8 ovários foram examinados após cada período de tempo de polinização. Um segundo ponto seria o fato de as polinizações terem sido feitas em ovários mantidos em placa de Petri. Pode-se supor que o substrato (água) tenha sido um fator de influência nas substâncias do ovário, alterando o processo de crescimento do tubo polínico. Uma maneira de se verificar essa hipótese, é variar o meio, como também seguir com polinizações na natureza, a título de controle.

A velocidade de crescimento do tubo polínico é muito dependente do ambiente; dentre eles, o principal é a temperatura. Essa pode ser uma outra provável hipótese para explicar a ausência de crescimento do tubo em material polinizado em placa de Petri. A temperatura no campo é mais elevada que a temperatura em laboratório.

Apesar dos insucessos das polinizações efetuadas em

ovários mantidos em placas de Petri, as polinizações efetuadas no campo foram melhor sucedidas, em termos de fertilização. Deve-se salientar que os primeiros cortes efetuados, praticamente não puderam ser analisados, devido à grande intensidade de coloração pela hematoxilina. Esse problema pôde ser contornado com uma diluição maior do referido corante. Passou-se, então, a trabalhar com hematoxilina a 0,25%, ao invés de se utilizar a concentração de 0,5%, como se fazia para óvulos oriundos de ovários não polinizados.

A entrada do tubo polínico no óvulo de 'Taquari' é pela micrópila e, conforme MAHESHWARI (1950), esta é a situação mais comum. Outro aspecto que deve ser ressaltado é quanto ao obturador. Pode ser claramente observada a passagem do tubo através dessa estrutura para atingir o óvulo e, segundo a literatura, ele facilita a entrada do tubo no óvulo (GRANER, 1935 ; MAHESHWARI, 1950). As lacunas que foram observadas no estilete, provavelmente foram deixadas por destruição das células no estilete, quando da passagem do tubo (Figura 40). Normalmente, o tubo passa nas células do estilete alterando-lhes a forma apenas por um período temporário, mas em algumas famílias, como *Lithraceae*, *Onagraceae* e *Curcubitaceae*, os tubos polínicos são muito largos e destroem as células do estilete, ao passarem por elas (MAHESHWARI, 1950). Esse é o caso em *Manihot*.

Pelas polinizações feitas no campo, pode-se deduzir que, dentro de um período de 48 horas, a fertilização ocorre. Conforme MAHESHWARI (1950), na maioria das plantas, o período entre a polinização e a fertilização é de 24 a 48 horas. É bastante difícil observar os gametas masculinos nos sacos embrionários. MEDINA (1960), ao estudar a fertilização em café, também encontrou dificuldades em observar os gametas masculinos no saco embrionário. Segundo MAHESHWARI (1950), as dificuldades de observação destes gametas são atribuídas aos seguintes fatores: o tempo entre o início e o final da fusão gamética é muito curto, e isso dificulta muito a coleta de material nesse estágio; um outro aspecto seria quanto aos cortes, pois o material cortado de maneira muito espessa tem problemas de coloração, e o material cortado em espessura muito fina, causa facilmente a perda de muitos cortes. Outros problemas, talvez os principais, que

podem ser apontados são: o material que o tubo polínico descarrega no saco embrionário, ao redor da célula-ovo, é um material que se colore muito intensamente, o que dificulta a visibilidade; outro aspecto é, também, quanto à visibilidade das sinérgides. Conforme foi observado, uma das sinérgides se degenera, promovendo uma intensa coloração pela hematoxilina na região da micróplia. Um dos últimos aspectos que poderia ser considerado, é que os núcleos vegetativos e os núcleos das sinérgides são facilmente confundíveis, na parte superior do saco embrionário.

Parece que a durabilidade da oosfera e dos núcleos polares não é um fator de grande estranheza, pois MEDINA (1960) encontrou oosfera em sacos embrionários com mais de dez dias de polinização, em *Coffea dewevrei*. A partir dos dez dias de polinização, MEDINA (1960) mencionou que a frequência dos sacos embrionários com oosfera e endosperma em desenvolvimento aumenta, e este parece ser o caso também em 'Taquari', conforme se verifica na Tabela 19 (só que, neste cultivar, o processo parece ser mais rápido que o processo citado por MEDINA (1960) em *C. dewevrei*). Pelos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o processo de fertilização ocorre logo após a polinização, e o desenvolvimento do endosperma se inicia logo em seguida, como pode ser visto em material com três dias de polinização.

Pelos resultados deste trabalho, pode-se concluir que o pólen parece ter um papel bem importante para a manutenção do saco embrionário, pois, conforme se verifica em óvulos com um dia após a antese, e sem terem sido polinizados, o estado de degenerescência é bastante avançado, pois o número de sinérgides e antípodas que se encontra é bem pequeno. Isso concorda com MEDINA (1960); que disse que em café, a degeneração do saco embrionário se inicia pelas antípodas. Aos seis dias após a antese, sem ter ocorrido a polinização, o estado de degenerescência do saco embrionário é bem maior, observando-se apenas a oosfera e os núcleos polares, na maioria dos casos. Isso parece sugerir que a presença do pólen é bem importante para manter o saco embrionário mais íntegro.

6. CONCLUSÕES

1. Foram detectadas barreiras externas e internas (incompletas) de isolamento reprodutivo;
2. Os resultados de cruzamentos sugerem aloincompatibilidade pré-zigótica ou pós-zigótica;
3. As autopolinizações parecem evidenciar auto-incompatibilidade em *M. tripartita*;
4. Foi constatada partenocarpia;
5. A microsporogênese é normal;
6. A esterilidade na flor masculina de *M. esculenta* 'Branca de Santa Catarina' é causada pela não degenerescência das células do tapete;
7. A megasporogênese e a megagametogênese são normais, do tipo "Polygonum".

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ALLARD, R. W. Genetic systems with colonizing ability in predominantly self-pollinated species. In: BAKER, H.G. & STEBBINS, G.L. ed. Genetics of colonizing species. New York, Academic, 1965, p. 49-76
- ALLEM, A. C. Notas taxonômicas e novos sinônimos em espécies de *Manihot* - VI (Euphorbiaceae). Bol. Museu Bot. Municipal de Curitiba, 40:1-14, 1980
- ANDERSON, E. Supraspecific variation in nature and its classification, from the view point of botany. Am. Nat., 71: 223-235, 1937
- ANDERSON, G.J. & STEBBINS, G.L. Dioecy versus gametophytic self-incompatibility: a test. Am. Nat., 124(3):423-428, 1984
- ARASU, N. T. Self-incompatibility in angiosperms: a review. Genetica, 39:1-24, 1968
- ARMBRUSTER, W.S. & WEBSTER, G.L. Pollination of two species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Mexico by Euglossine bees. Biotropica, 11(4):278-283, 1979
- ARMECIN, C.F. & CARPENA, A.L. Determination of the nature of tetraploidy in cassava through meiotic analysis. Ann. Trop. Res., 4:77-84, 1982
- ARROYO, M.T.K. Chiasma frequency evidence on the evolution of autogamy in *Limnanthes floccosa* (Limnanthaceae). Evolution, 27:679-688, 1973

- ASHTON, P.S. Speciation among tropical forest trees. Some deductions in the light of recent evidence. Biol.J.Linn. Soc., 1:155-196, 1969
- AUGSPURGER, C. Mass flowering of a tropical shrub (*Hybanthus prunifolius*): influence on pollinator attraction and movement. Evolution, 34(3):475-488, 1980
- BAKER, H.G. Self-compatibility and establishment after "long distance" dispersal. Evolution, 9:347-348, 1955
- & BAKER, I. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. Am.J.Bot., 66(5):591-600, 1979
- BARRET, S.C.H. Genetic variation in weeds. In: CHARUDATTAN, R. & WALKER, H.L. eds. Biological control of weeds with plant pathogens. New York, John Wiley, 1982, p. 73-98
- BATEMAN, A.J. Self-incompatibility systems in angiosperms. Heredity, 6:285-310, 1952
- BAWA, K.S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. Evolution, 28:85-92, 1974
- Evolution of dioecy in flowering plants. Ann. Rev. Ecol. Syst., 11:15-39, 1980
- Patterns of flowering in tropical plants. In: JONES, C.E. & LITTLE, R.J. eds. Handbook of experimental pollination biology. New York, Academic, 1983, p. 394-410
- & BEACH, J.H. Evolution of sexual systems in flowering plants. Ann.Mo. Bot. Gard., 68(2):254-274, 1981
- ; BULLOCK, S.H.; PERRY, D.R.; COVILLE, R.E. & GRAYUM, M. H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination systems. Am. J. Bot., 72:346-356, 1985
- & OPLER, P.A. Dioecism in tropical forest trees.

- Evolution, 29:167-179, 1975
- & WEBB, C.J. Floral variation and sexual differentiation in *Mutingia calabura* (Eleocarpaceae) a species with hermaphrodite flowers. Evolution, 37(6):1271-1282, 1983
- BEÇAK, W. & PAULETE, J. Técnicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1976, V.1, 305 p.
- BELL, C.R. Mineral nutrition and flower to flower pollen size variation. Am. J. Bot., 46:621-624, 1959
- BRIGGS, D. & WALTERS, S.M. Plant and variation. Univ. Pr., 1984, 412 p.
- BULLOCK, S.H. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. Biotropica, 17(4):287-301, 1985
- CARROL, C.P. Flowering behaviour and fertility in dihaploid *Solanum tuberosum*. Potato Res., 18(3):416-427, 1975
- & LOW, R.J. Aspects of male fertility in group *Tuberosum* dihaploids. Potato Res., 19(1):109:121, 1976
- CHAPMAN, G.P. Pollination and the yields of tropical crops: an appraisal. Euphytica, 13:187-197, 1964
- CHODA, S.P. & MEHRA, P.M. Cytological studies in some Euphorbiaceae. Curr. Sci., 41:76, 1972
- CHUWDHURY, J.B. & DAS, K. Cytomorphological studies on male sterility in *Brassica campestris* L. Cytologia, 33:195-199, 1968
- COCK, J.H. Cassava: new potential for a neglected crop. London. Westvien Press, 1984, 191 p.

- CONCEIÇÃO, A.J. A mandioca. São Paulo, Nobel, 1981, 328 p.
- CROWE, L.K. The evolution of outbreeding in plants. I. The angiosperms. Heredity, 19:435-457, 1964
- CRUDEN, R.W. Pollen-ovule ratio: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution, 31(1): 32-46, 1977
- CRUZ, N.D. da Nova espécie do gênero *Manihot* Adans do Estado de São Paulo. Bragantia, Campinas, 24(28):359-368, 1965
- Nova espécie do gênero *Manihot* Adans do Estado de Minas Gerais. Bragantia, Campinas, 26(23):317-328, 1967
- Citologia no gênero *Manihot* Adans. I. Determinação do número de cromossomos em algumas espécies. An. Acad. Bras. Cienc., 40(1):91-95, 1968
- DARLINGTON, C.D. The evolution of genetic systems. Cambridge, Cambridge Univ. Pr., 1939, 149 p.
- DAVIS, G.L. Systematic embryology of the angiosperms. New York, John Wiley, 1966, 526 p.
- DEVLIN, B. & STEPHENSON, A.G. Sex differential floral longevity, nectar secretion and pollinator foraging in a protandrous species. Am. J. Bot., 72(2):303-310, 1985
- DOBZHANSKY, T. Genetics and the origin of species. 3a. ed., New York, Columbia Univ. Pr., 1951, 364 p.
- EHRENFELD, J. Reproductive biology of three species of *Euphorbia* subgenus *Chamaesyce* (Euphorbiaceae). Am. J. Bot., 63(4):406-413, 1976
- FAHN, A. Plant Anatomy. 2a. ed., Oxford, Pergamon, 1974, 611 p.

- FOX, J.F. Incidence of dioecy in relation to growth form ,
pollination and dispersal. Oecologia, 67:244-249, 1985
- FRANKEL, R. & GALUN, E. Pollination mechanisms, reproduc-
tion and plant breeding. Berlin, Springs-Verlag, 1977
(Monographs on theoretical and applied genetics , 2) ,
p. 281
- FRYXELL, P.A. Mode of reproduction of higher plants. Bot.
Rev., 23(3):135-233, 1957
- GANESHAIAH, K.N. & SHAAKER, R.U. Evolution of reproductive
behavior in the genus *Eleusine*. Euphytica, 31(2):397-404,
1982
- GENTRY, A.H. Coevolutionary patterns in Central American Big-
noniaceae. Ann. Mo. Bot. Gard., 61:725-759, 1974
- GEORGE, W.L. Jr. & SHIFRISS, O. Interspersed sexuality in
Ricinus. Genetics, 57:347-356, 1967
- GIBBS, P.E.; MILNE, C. & VARGAS CARRILLO, M. Correlation
between the breeding system and recombination index in
five species of *Senecio* . New Phytol., 75:619-626, 1975
- GIOELLI, F. Embriologia del *Manihot esculenta* Crantz. Lavo-
ri Del R. Instituto Botanico di Palermo, 4:256-261, 1933
- GODLEY, E.J. Monoecy and incompatibility. Nature, 176:1176-
1177, 1955
- GRANER, E.A. Contribuição para o estudo citológico da mandio-
ca. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", 1935, 28 p.
- Tratamento da mandioca pela colchicina. I. Nota
preliminar sobre poliploidia indicada pela diferença de
tamanho dos estômatos. J. Agron., Piracicaba, 3(2):83-
98, 1940

- Polyploid cassava induced by colchicine treatment.
J. Hered., 32(8):281-288, 1941
- Notas sobre o florescimento e frutificação da mandioca. Bragantia, Campinas, 2:1-12, 1942a.
- Tratamento da mandioca pela colchicina. II. Formas poliplóides obtidas. Bragantia, Campinas, 2:23-54, 1942b.
- Uma forma tetraplóide de mandioca Vassourinha de provável valor hortícola. Rev. Agr., Piracicaba, 19(9-10/11-12):380-391, 1944
- GRANT, V. Pollination system as isolating mechanisms in angiosperms. Evolution, 3:82-97, 1949
- Plant speciation. New York, Columbia Univ. Pr., 1971, 435 p.
- Genetics of flowering plants. New York, Columbia Univ. Pr., 1975, 514 p.
- Gene flow and homogeneity of species populations. Biol. Zbl., 99:157-169, 1980
- GRATTAPAGLIA, D.; NASSAR, N.M.A. & DIANESE, J.C. Biossistemática de espécies brasileiras do gênero *Manihot* baseada em padrões de proteína da semente. Ci. Cult., 39(3):294-300, 1987
- GRAZI, F.; UMAERUS, M. & AKERBERG, E. Observations on the mode of reproduction and the embryology of *Poa pratensis*. Hereditas, 46:489-541, 1961
- GUSTAFSSON, A.H. The plant species in relation to polyploidy and apomixis. Hereditas, 32:444-448, 1946
- GUSTAFSON, F.G. Further studies on artificial parthenocarpy. Am. J. Bot., 25:237-244, 1938

- Auxin distribution in fruits and its significance in fruit development. Amer. J. Bot., 26:189-193, 1939
- Parthenocarpy: natural and artificial. Bot. Rev., 8:599-654, 1942
- HADLEY, E.B. & LEVIN, D.A. Habitat differences of three *Liatris* species and their hybrid derivatives in an interbreeding population. Am. J. Bot., 54:550-559, 1967
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation with and among natural forest population. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRYDE, B. & THOMAS, W.L. eds. Genetics and conservation. London, Cummings, 1983, p. 335-348
- ; LINHART, Y.B. & MILTON, J.B. Relationship between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. Annu. Rev. Ecol. Syst., 10:173-200, 1979
- HANS, A.S. Chromosomal conspectus of the Euphorbiaceae. Taxon, 22:591-636, 1973
- HARLAN, J.R. Anatomy of the gene centers. Am. Nat., 85:97-103, 1951
- Agricultural origins: centers and non-centers. Science, 174:468-474, 1971
- HEISER, C.B. Jr. Sementes para a Civilização. São Paulo, EDUSP, 1973. 253 p.
- HERR, J.M. Jr. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. Am. J. Bot., 58(8): 787-790, 1971
- HERSHEY, C. & AMAYA, A. Genética, citogenética, estrutura floral y técnicas de hibridación de la yuca. In: Yuca: investigación, producción y utilización. Cali, CIAT, 1982, p. 113-126

- JAIN, S.K. The evolution of inbreeding in plants. Rev. Ecol. Syst., 7:469-495, 1976
- JAKUBIEC, C.J. Microsporogenesis in dihaploids of *Solanum tuberosum* (2n=24) and its hybrids with diploid wild species. Potato Res., 16(4):315-316, 1973
- JANZEN, D.H. Synchronization of sexual reproduction of trees within the dry season in Central America. Evolution, 21: 620-637, 1967
- Euglossine bees as a long-distance pollination of tropical plants. Science, 171:203-205, 1971
- JENNINGS, D.L. *Manihot melanobasis* Müll. Arg. - A useful parent for cassava breeding. Euphytica, 8:157-162, 1959
- Variation in pollen and ovule fertility in varieties of cassava, and the effect of interespecific crossing on fertility. Euphytica, 12:69-76, 1963
- Cassava. In: SIMONDS, N.W. Evolution of crop plants, New York, Longman, 1976, p. 81-83
- JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill, 1939, 523 p.
- JOLY, A.B. Introdução à taxonomia vegetal. São Paulo, EDUSP, 1976, 777 p.
- JONG, K. Cytology of Dipterocarpaceae. In: BURLEY, J. & STYLES, B.T. Tropical trees: variation, breeding, and conservation. London, Academic, 1976, 243 p.
- JONG, J. DE & KHO, Y. O. The shrivelling of pollinated pistils as an aid to rapid determination of *Crysanthemum* pollen viability. Euphytica, 31:519-521, 1982
- JOS, J.S. & BAI, B. Functional male sterility in cassava. Curr. Sci., 50(23):1035-1036, 1981

- KANNENBERG, L.W. & ALLARD, R.W. Population studies in predominantly self-pollinated species. VII. Genetic variability in the *Festuca microstachys* complex. Evolution, 21:227-240, 1967.
- KAWANO, K. Genetic improvement of cassava (*M. esculenta* Crantz) for productivity. Trop. Agr. Research, Serie No. 11:9-21, 1978
- ; AMAYA, A.; DAZA, P. & RIOS, M. Factors affecting efficiency of hybridization and selection in cassava. Crop. Sci., 18:373-376, 1978
- KEVAN, P.G. Floral colors through the insect eye: what they are, what they mean. In: JONES, C.E. & LITTLE, R. J. eds. Handbook of experimental pollination biology. New York, Academic, 1983, p. 3-30
- KNOX, R.B. Apomixis: seasonal and population differences in a grass. Science, 157:325-326, 1967
- LAWRENCE, G.H.M. Taxonomy of vascular plants. 6th Ed., New York, Macmillan Co., 1971, 823 p.
- LÉON, J. Origin, evolution and early dispersal of root and tuber crops. In: Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, 1977, p. 20-36
- LEVIN, D.A. The origin of isolating mechanisms in flowering plants. Evol. Biol., 11:185-289, 1978
- The nature of plant species. Science, 204:381-384, 1979
- & BERUBE, D.E. *Phlox* and *Colius* - the efficiency of a pollination system. Evolution, 26:242-250, 1972
- LESLEY, M.N. & LESLEY, J. Parthenocarpy in a tomato deficient for a part of a chromosome in its aneuploid prophase. Genetics, 26:374-386, 1941

- LEWIS, D. Genetic versatility of incompatibility in plants. N. Z. J. Bot., 17:637-644, 1979
- LORENZI, J.O. & MONTEIRO, D.A. A mandioca (*M. esculenta* Crantz) como matéria prima de etanol no Brasil. Campinas, Instituto Agronômico, 1980. 80 p. (Bol. Técnico, 67)
- LUNDQUIST, A. The mode of origin of self-fertility in grasses. Heredity, 59:413-426, 1968
- MAGOON, M.L. Cytogenetics of the F₁ hybrid between cassava and Ceara rubber and its backcrosses. Genetica, 41:425-436, 1970
- ; KRISHNAN, R. & VIJAYA BAI, K. Morphology of the pachytene chromosomes and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. Cytologia, 34:612-626, 1968
- MAGUIRE, B. Apomixis in the genus *Clusia* (Clusiaceae). A preliminary report. Taxon, 25(2/3):241-244, 1976
- MAHESHWARI, P. The angiosperm embryo sac. Bot. Rev., 14:1-56, 1948
- An introduction to the embryology of angiosperm. New York. McGraw-Hill, 1950, 453 p.
- MAYR, E. Populações, espécies e evolução. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1977, 485 p.
- MEDINA, D.M. Macrosporogênese, formação e desenvolvimento do saco embrionário, do endosperma e do embrião em *Coffea dewveirei* De Wild. et Th. Bur. Bragantia, Campinas, 19(48): 767-784, 1960
- & CONAGIN, C.H.T.M. Técnica citológica. Campinas, Instituto Agronômico, 1964. (Publ., 2610)
- MONTEIRO, D.A.; LORENZI, J.O.; VALLE, T.L.; PEREIRA, A.S. & SABINO, J.C. Produção de sementes de mandioca em plantas

- com um e dois ciclos vegetativos. Bragantia, Campinas, 43(2):667-672, 1984
- MUELLER ARGOVIENSIS, J. Euphorbiaceae. In: MARTIUS, C.F.P. De Flora brasiliensis. Monachii, Lithograph. B. Keller, 1874, v. 11 (parte 2), p. 437-486
- NASSAR, N.M.A. Microcenters of wild cassava, *Manihot* spp., diversity in Central Brazil. Turrialba, 28(4):345-347, 1978a.
- Conservation of the genetic resources of cassava (*Manihot esculenta*) determination of wild species localities with emphasis on probable origin. Econ. Bot., 32(4): 311-320, 1978b.
- Wild *Manihot* species of Central Brazil for cassava breeding. Can. J. Plant Sci., 58:257-261, 1978c.
- Attempts to hybridize wild *Manihot* species with cassava. Econ. Bot., 34(1):13-15, 1980
- *Manihot neuzana* Nassar: uma nova espécie nativa do Paranã, Brasil. Ci. e Cult., 38(2):338-340, 1986
- NORMANHA, E.S. & PEREIRA, A.S. Aspectos agronômicos da cultura da mandioca. Bragantia, Campinas, 10(7):179-202, 1950
- NYGREN, A. Form and biotype formation in *Calamagrostis purpurea*. Hereditas, 37:519-532, 1951
- OPLER, P.A. & BAWA, K.S. Sex ratios in tropical forest trees. Evolution, 32:812-821, 1978
- PANDEY, K.K. Evolution of gametophytic and sporophytic systems of self-incompatibility in angiosperms. Evolution, 14:98-115, 1960
- PAX, F. Euphorbiaceae-Adrianeae. In: ENGLER, A. Das Pflanzenreich regni vegetabilis conspectus, Leipzig, W. Engelmann, 1910, v.21, p. 21-211

- PEREIRA, A.S.; LORENZI, J.O.; NORMANHA, E.S. & SILVA, J.R. da
Taxa de fecundação cruzada no cultivar de mandioca Branca
de Santa Catarina. Bragantia, Campinas, 37:XCV-XCVI,
1978
- PERRY, B.A. Chromosome number and phylogenetic relationship
in the Euphorbiaceae. Am. J. Bot., 30(7):527-543, 1943
- PHILBRICK, C.T. & ANDERSON, G.J. Importance of pollen/ovule
ratios and pollen size for the reproductive biology of *Po-
tamogeton* and autogamy in aquatic angiosperms. Syst.Bot.,
12(1):98-105, 1987
- PIKE, L.M. & PETERSON, C.E. Inheritance of parthenocarpy in
the cucumber (*Cucumis sativus*). Euphytica, 18:101-105,
1969
- PRAKASH, N. Embryological studies in economic plants. N.J.
Z.Bot., 17:525-534, 1979
- PURSEGLOVE, J.W. Tropical Crops: Dicotyledons. London,
Longman, 1968. 719 p.
- PURVIS, M.J.; COLLIER, D.C. & WALLS, D. Laboratory techni-
ques in botany, London, Butterworths, 1964, 371 p.
- RAVEN, P.H. The bases of angiosperm phylogeny: cytology.
Ann. Mo. Bot. Gard., 62(3):724-764, 1975
- RENVOIZE, B.S. The area of origin of *Manihot esculenta* as a
crop plant: a review of the evidence. Econ. Bot., 26:352-
360, 1972
- RICK, C.M.; FOBES, J.F. & TANKSLEY, S.D. Evolution of mating
systems in *Lycopersicon hirsutum* as deduced from genetic
variation on morphological characters. Plant Syst. Evol.,
132:279-298, 1979
- ; HOLLE, M. & THORP, R.W. Rates of cross-pollina-
tion in *Lycopersicon pimpinellifolium* impact of genetic

- variation in floral characters. Plant. Syst. Evol., 129: 31-44, 1978
- ROGERS, D.J. Intraspecific categories of *M. esculenta*. Science, 126:1234-1235, 1957
- Origin and development of *M. esculenta* and allied species. Am. J. Bot., 49(6):678, 1962
- Studies of *Manihot esculenta* Crantz and related species. Bull. Torrey Bot. Club, 90(1):43-54, 1963
- Some botanical ethnological consideration of *M. esculenta*. Econ. Bot., 19:369-377, 1965
- & APPAN, S.G. Flora neotropica: manihot, manihotoides (Euphorbiaceae). New York. Hafner Press, 1973, (Monograph 13), 272 p.
- & FLEMMING, H.S. Monograph of *Manihot esculenta* Crantz. Econ. Bot., 27:1-114, 1973
- SCHMIDT, C.B. A mandioca: contribuição para o conhecimento de sua origem. B. de Agric., São Paulo, 52:73-128, 1951
- SIMPSON, B.B. & NEFF, J.L. Evolution and diversity of floral rewards. In: JONES, C.E. & LITTLE, R.J. eds. Handbook of experimental pollination biology. New York, Academic, 1983, p. 142-159
- SINGH, R.P. Structure and development of seeds in Euphorbiaceae *Ricinus comunis*. Phytomorphology, 4:118-123, 1964
- SMITH, J.M. Evolution in sexual and asexual populations. Am. Nat., 102(927):469-473, 1968
- SOBREVILA, C. & ARROYO, M.T.K. Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. Plant Syst. Evol., 140:19-37, 1982

- SOHMER, S.H. Microsporogenesis in *Manihot esculenta*.
Cytologia, 33:97-99, 1968
- SOLBRIG, O.T. Principles and methods on plants biosystematics. London, MacMillan, 1971. 226 p.
- & ROLLINS, R.C. The evolution of autogamy in species of the mustard genus *Leavenworthia*. Evolution, 31:265-281, 1977
- SRIVASTAVA, R.K. Contribution to the embryology of Indian Euphorbiaceae. I. *Euphorbia rothiana*. Ann. Bot., 16:505-511, 1952
- STEBBINS, G.L. The significance of polyploidy in plant evolution. Am. Nat., 74:54-66, 1940
- Apomixis in the angiosperms. Bot. Rev., 7(10):507-542, 1941
- Variation and evolution in plants. New York. Columbia Univ. Pr., 1950, 643 p.
- Self-fertilization and population variability in the higher plants. Am. Nat., 91:337-354, 1957
- Chromosomal variation and evolution. Science, 152:1463, 1966
- Chromosomal evolution in higher plants. Great Britain, Addison-Wesley, 1971, 216 p.
- STEINER, K.E. Pollination of *Mabea occidentalis* (Euphorbiaceae) in Panama. Syst. Bot., 8(2):105-117, 1983
- STYLES, F.G. Flowering seasons of hummingbird pollinated plants in a tropical forest. Science, 198:1177-1178, 1977
- SWANSON, C.P. Cytology and cytogenetics. London, MacMillan, 1965, 596 p.

- TANNER, E.V.J. - Species diversity and reproductive mechanisms in Jamaica trees. Biol. J. Linn. Soc., 18:263-278, 1982
- TARODA, N. & GIBBS, P.E. Floral biology and breeding system of *Sterculia chicha* St. Hil. (Sterculiaceae). New Phytol. 90:735-743, 1982
- UMANA, E.E. & HARTMANN, R.W. Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot* species. J.Am.Hort.Sci., 98(3):272-274, 1973
- URBANSKA, K.M. Plant reproductive strategies. In: GRANT, W. F. Plant biosystematics. New York, Academic, 1984, p. 211-228
- VIÉGAS, A.P. Estudos sobre a mandioca. IAC/BRASCAN/NORDESTE, 1976, 214 p.
- WEBB, C.J. Constraints on the evolution of plant breeding systems and their relevance to systematics. In: GRANT, W. F. Plant biosystematics. New York, Academic, 1984, p. 249-270
- WEBSTER, G.L. The genera of Euphorbiaceae in the Southeastern United States. J. Arnold Arbor., 48:303-430, 1967
- Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae. Taxon, 24:593-601, 1975
- & ELLIS, J.R. Cytotaxonomic studies in the Euphorbiaceae, subtribe Phyllanthinae. Am. J. Bot., 49:14-18, 1962
- WILLEY, G.R. New World Prehistory. Science, 131(3393):73-86, 1960
- WILSON, M.F. Sexual selection and dicliny in angiosperms. Am. Nat., 119(4):579-583, 1982
- WODEHOUSE, R.P. Pollen grains: their structure, identification and significance in Science and Medicine. New York, McGraw-Hill Book Co., 1935. 574 p.