

ARTIGO DE REVISÃO

APOMIXIA: UM MÉTODO ALTERNATIVO PARA A PRODUÇÃO DE SEMENTES EM PLANTAS

LUCIANE GAUER¹, SUZANA CAVALLI-MOLINA²

RESUMO - A apomixia é um método geneticamente controlado de reprodução em plantas onde o embrião é formado sem a união dos gametas feminino e masculino. Há três tipos básicos de apomixia: aposporia, diplosporia e embrionia adventícia. Na maioria das espécies apomíticas, a pseudogamia é necessária para o desenvolvimento do endosperma e conseqüente viabilidade do embrião. A apomixia pode ser detectada a partir de diferentes técnicas, como a análise de sacos embrionários, testes de progênes, análise da deposição de calose nas paredes celulares, teste de auxina, entre outros. A apomixia apresenta uma vantagem para o melhoramento vegetal por permitir a perpetuação de um dado genótipo, preservando as características de interesse, ao longo das gerações, via semente. As informações obtidas até o momento quanto à genética da apomixia sugerem que esta característica é controlada por poucos genes de efeito dominante, o que favorece a manipulação desta característica em programas de melhoramento.

Palavras-chave: reprodução assexual, apomixia, pseudogamia, melhoramento de plantas

APOMIXIS: AN ALTERNATIVE METHOD OF SEED PRODUCTION IN PLANTS

ABSTRACT- Apomixis is a method genetically determined of reproduction in plants, in which embryo is formed without the union of male and female gametes. There are three basic mechanisms of apomixis: apospory, diplospory and adventitious embryony. In most apomitic species, the pseudogamy is necessary for the endosperm development and consequent embryo viability. Apomixis can be detected through several techniques as embryo sac cytological analysis, progeny tests, callose deposition analysis in cell walls, auxin tests, among others. Apomixis represents an advantage for plant improvement because it allows the fixation of superior genotypes by succeeding generations. The available information about the genetics of apomixis suggests that this characteristic is controlled by few dominant genes, which favors the manipulation of this characteristic in breeding programs.

Key words: asexual reproduction, apomixis, pseudogamy, plant breeding

INTRODUÇÃO

A maioria das plantas superiores se reproduz sexualmente. A reprodução sexual gera variabilidade genética, através de mecanismos de recombinação gênica como a permuta ("crossing-over") entre os cromossomos homólogos durante a prófase da meiose I, a segregação aleatória dos cromossomos homólogos na anáfase I, ou ainda pelas diversas possibilidades de reunião dos gametas femininos e masculinos durante a fecundação. Em muitas espécies de plantas, porém, a fertilização e a meiose podem não estar envolvidas na formação da semente, e esta é formada por um processo assexual denominado apomixia.

A apomixia ocorre em todo o reino vegetal,

desde algas até angiospermas. Entre as angiospermas (tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas), mais do que 300 espécies de plantas de mais de 35 famílias, têm sido descritas como apomíticas, com um padrão de distribuição que indica uma origem polifilética (ASKER e JERLING, 1992). Segundo RICHARDS (1986), a apomixia é encontrada principalmente nas famílias Gramineae, Compositae, Rosaceae e Rutaceae.

A apomixia é um método geneticamente controlado de reprodução em plantas. O termo apomixia, no seu sentido mais amplo, significa "longe da mistura", pois *apo* quer dizer "longe de" e *mixia* "mistura" (WINKLER *apud* ASKER e JERLING, 1992). Neste tipo de reprodução, o embrião se desenvolve no ovário a partir de uma

¹Bióloga, M.Sc

²Bióloga, Dra., Professora Adjunta, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, CEP91501-970, Porto Alegre, RS. E-mail: scmolina@if.ufrgs.br Autor para correspondência.
Recebido para publicação em 24/08/1999.

célula somática do óvulo, ocorrendo a formação de sementes férteis, sem haver a união do gameta feminino com o masculino, como ocorre na reprodução sexual (KOLTUNOW, 1993). Há três tipos básicos de mecanismos apomíticos: diplosporia, aposporia e embrionia adventícia, distinção esta baseada no sítio de origem e subsequente padrão de desenvolvimento da célula, que dará origem ao embrião.

Por muitos anos a apomixia foi considerada uma barreira ao melhoramento. Entretanto, nas últimas duas décadas, este modo de reprodução tem recebido uma grande atenção devido à descoberta de plantas parcialmente apomíticas (apomíticas facultativas) em espécies cultivadas (HANNA e POWELL, 1973; ARTHUR et al., 1993), à descoberta de plantas sexuais em espécies apomíticas (BASHAW, 1962; HANNA et al., 1973) e à obtenção de novas informações sobre o controle genético da apomixia (BASHAW, 1980; NOGLER, 1984; KOLTUNOW, 1993). Estas descobertas são de grande importância para a utilização da apomixia em programas de melhoramento. Segundo HANNA (1995), a apomixia pode ter um grande impacto na produção de alimentos, forrageiras e fibras, que são propagadas por semente, em todo o mundo. A principal vantagem da apomixia no melhoramento vegetal refere-se ao fato dos embriões apomíticos serem, via de regra, originados por divisões mitóticas de uma célula somática do óvulo, tornando-os geneticamente idênticos à planta-mãe. Esta situação traz um óbvio benefício à agricultura, pois se a apomixia puder ser introduzida em grupos de plantas economicamente importantes, ela poderá ser um meio de perpetuar um dado genótipo, preservando características de interesse, como a heterose, ao longo das gerações via semente (HANNA e BASHAW, 1987).

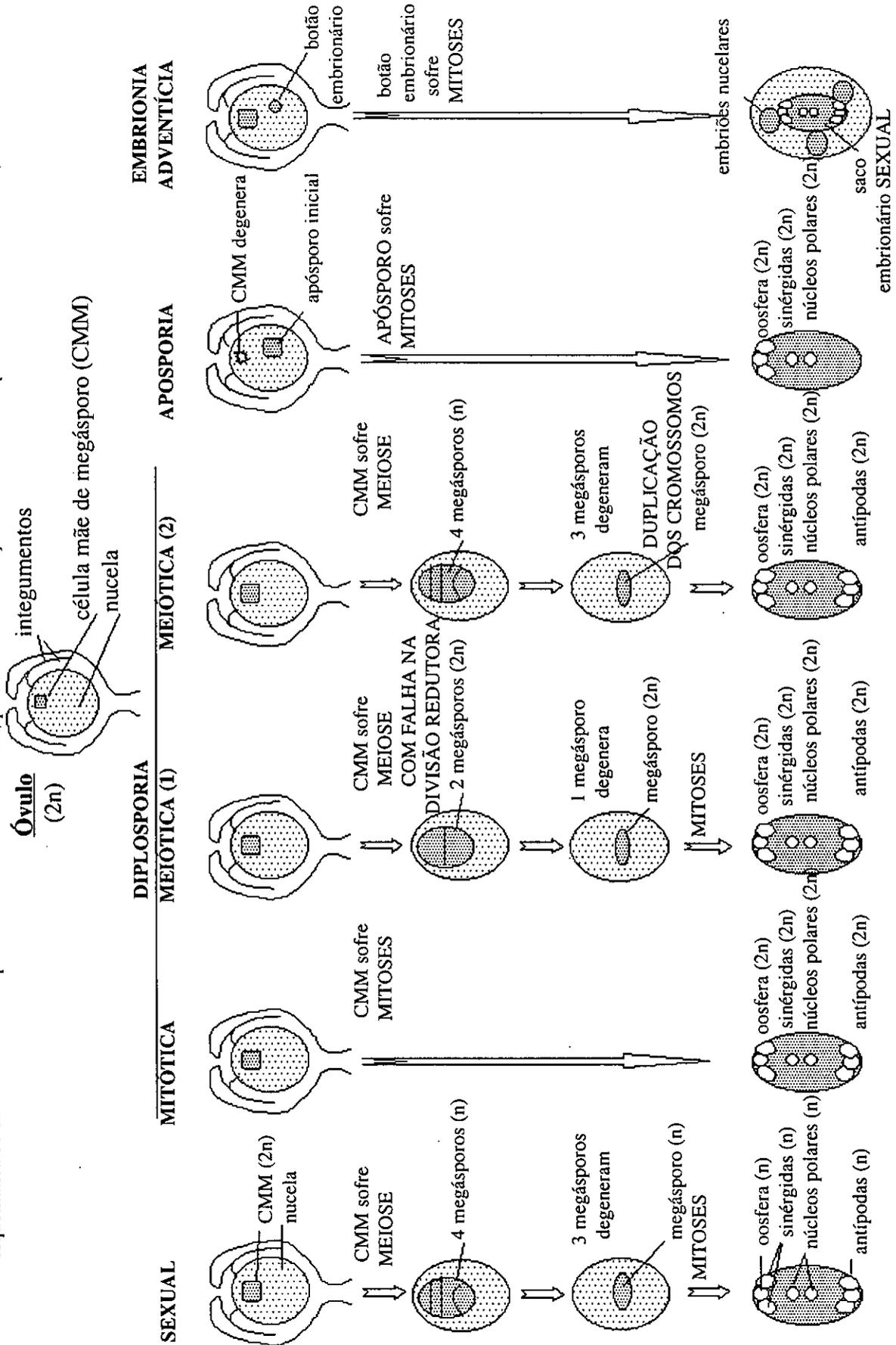
O propósito desta revisão é descrever os tipos de apomixia, os métodos para sua identificação, a base genética da apomixia e a sua importância na produção agrícola.

MECANISMOS DA APOMIXIA

Segundo KOLTUNOW (1993), na reprodução sexual, o óvulo tem um papel multifuncional devido ao fato de no mesmo ocorrer os processos sequenciais da gametogênese feminina, fertilização e desenvolvimento do embrião. Uma seqüência definida de eventos deve ocorrer para resultar na geração de uma única semente fértil, que é o produto final da reprodução sexual nas angiospermas. Essa seqüência compreende os seguintes eventos (Figura 1): desenvolvimento de uma célula localizada no tecido nucelar (a célula arqueosporial) que cresce mais que as vizinhas, formando a célula mãe de megásporo; a produção de megásporos através de meiose (megasporogênese); degeneração de alguns megásporos; desenvolvimento do saco embrionário por mitoses (megagametogênese); maturação do saco embrionário e dupla fertilização, fenômeno caracterizado pelo encontro de um dos núcleos germinativos do grão de pólen com a oosfera, formando o zigoto e do outro núcleo com os núcleos polares do saco embrionário, formando o endosperma.

Segundo KOLTUNOW (1993), os mecanismos apomíticos diferem no momento em que são iniciados durante o desenvolvimento do óvulo em relação à via sexual normal. Os processos diplospóricos e apospóricos surgem no início do desenvolvimento do óvulo: no momento da diferenciação da célula mãe de megásporo, na diplosporia, e após a diferenciação da célula mãe de megásporo, na aposporia. A diplosporia e a aposporia resultam na formação de uma estrutura megagametofítica (saco embrionário), geralmente sem redução meiótica, e o embrião desenvolve-se de uma das células deste megagametófito não reduzido. Por isso estes dois mecanismos são referidos como processos apomíticos gametofíticos. Em contraste, a embrionia adventícia é iniciada tardiamente no desenvolvimento do óvulo, geralmente ocorrendo em óvulos maduros. Os embriões originam-se de tecidos somáticos do óvulo, não havendo a formação de saco embrionário, por esta razão sendo denominado de apomixia

Figura 1: Mecanismos apomíticos: diplosporia mitótica e meiótica, aposporia e embrionia adventícia, comparados com os eventos da reprodução sexual. A representação esquemática de cada mecanismo representa a forma mais comum, podendo haver variações em diferentes espécies.



esporofítica (NOGLER, 1984; ASKER e JERLING, 1992). A maioria das plantas apomíticas são poliplóides, entretanto, gêneros com embriões adventícia normalmente são diplóides (ASKER e JERLING, 1992).

DIPLOSPORIA

Neste tipo de reprodução apomítica, o embrião e o endosperma desenvolvem-se de um saco embriônico não reduzido cromossomicamente, derivado da célula mãe de megásporo. A diferenciação da célula mãe de megásporo é semelhante a de óvulos sexuais, mas o núcleo não sofre meiose ou, alternativamente, passa por uma meiose alterada. Deste modo, há dois tipos de diplosporia, a mitótica e a meiótica, como mostra a Figura 1.

Na diplosporia mitótica, o tipo mais comum de diplosporia, a meiose é totalmente inibida (NOGLER, 1984). A célula mãe de megásporo se diferencia, mas o seu núcleo, ao invés de se dividir por meiose, o faz por mitoses, com a célula aumentando consideravelmente de tamanho sem se dividir. Os núcleos resultantes da primeira divisão mitótica migram para os pólos opostos da célula, normalmente se assemelhando ao estágio binucleado do saco embriônico sexual. As divisões mitóticas subsequentes e a diferenciação do saco embriônico variam entre diferentes espécies.

Segundo BASHAW (1980), na diplosporia meiótica, a célula mãe de megásporo diferencia-se da nucela e a meiose é iniciada, mas os núcleos do saco embriônico recebem um número cromossômico não reduzido que pode ser devido a uma falha na divisão redutora, ou seja, a não separação dos cromossomos homólogos na meiose I, ou pela duplicação espontânea do número cromossômico do megásporo funcional após a meiose. Neste último caso também há a formação de saco embriônico não reduzido. Entretanto, a progênie de plantas heterozigotas não será uniforme e nem idêntica à planta-mãe, apesar de terem sido originadas por reprodução assexuada, apresentando descendentes homozigotos para distintos alelos. Este tipo de diplosporia não tem sido relatada em espécies de importância agrônômica, tendo pouco interesse no melhoramento de plantas.

Em ambos tipos de diplosporia, mitótica e meiótica, a célula mãe de megásporo produz um saco embriônico não reduzido contendo o mesmo número de células e o mesmo arranjo que um saco

embriônico sexual.

AOSPORIA

Diferentemente do processo diplospórico, o saco embriônico apospórico não se origina da célula mãe de megásporo, mas se forma de células adicionais que se diferenciam da nucela. Estas células, chamadas apospóros iniciais, assemelham-se à célula mãe de megásporo sexual, possuindo um grande núcleo e um citoplasma denso (KOLTUNOW, 1993).

Os apospóros iniciais dão origem a um saco embriônico não reduzido por mitose. Entretanto, processos apospóricos e sexuais podem coexistir num mesmo óvulo, o que não é possível em apomíticos diplospóricos. Análises citológicas de espécies apospóricas têm mostrado que um ou mais apospóros iniciais podem se diferenciar da nucela, próximos à célula, envolvida na reprodução sexual, em qualquer estágio da megasporogênese ou megagametogênese e iniciar a formação de um saco embriônico apospórico. Sacos embriônicos apospóricos parecem se desenvolver mais rapidamente que os sexuais devido ao fato de seu processo de formação não requerer divisões meióticas. A percentagem de óvulos, contendo tanto sacos embriônicos sexual e apospóricos, é alto em algumas espécies apomíticas, entretanto, os produtos do processo sexual, muitas vezes, tendem a degenerar (NOGLER, 1984; ASKER e JERLING, 1992; KOLTUNOW, 1993). O momento da iniciação da aposporia é muitas vezes um indicador da coexistência de processos sexuais e apospóricos. Em *Potentilla*, por exemplo, tem sido observado que quando os apospóros iniciais aparecem mais cedo é provável que os processos sexuais sejam inibidos. Se os apospóros iniciais se diferenciarem posteriormente, quando a formação do megagametófito sexual estiver relativamente avançada, ambos os tipos de sacos embriônicos poderão coexistir (NOGLER, 1984; RICHARDS, 1986; BASHAW e HANNA, 1990).

Em óvulos de plantas sexuais e apomíticas diplospóricas somente uma célula diferencia-se, dando origem ao saco embriônico. Segundo KOLTUNOW (1993), isso sugere que, na maioria das plantas, um mecanismo seletivo opera para limitar o número de células, que podem diferenciar-se da nucela e que plantas apomíticas apospóricas têm desviado essa limitação. O fato, de que os

apósporos iniciais desenvolvem-se na zona adjacente à célula progenitora do saco embrionário sexual (NOGLER, 1984), sugere que o sinal que especifica a célula mãe de megásporo se expanda e atinja células da nucela ou que um controle restritivo, que impede a diferenciação em grande escala de várias células, esteja relaxado em plantas apospóricas (KOLTUNOW, 1993).

EMBRIONIA ADVENTÍCIA

Os embriões adventícios desenvolvem-se a partir de divisões mitóticas de células somáticas do óvulo (principalmente da nucela), integumentos ou da parede do ovário. As células destinadas a se tornarem embriões são morfologicamente distinguíveis do restante das células pelo seu grande núcleo e denso citoplasma (WILMS et al., 1983; BRUCK e WALKER, 1985). Entretanto, estas células são semelhantes à célula-ovo (ou oosfera) no que se refere ao potencial de desenvolvimento, apesar de não serem rodeadas pelo saco embrionário, como no processo sexual ou apomítico apospórico e diplospórico, mas por células da nucela. Portanto, a embrionia gera um esporófito independente da presença de um saco embrionário (KOLTUNOW, 1993). A proliferação desta célula forma uma estrutura semelhante a um botão (BASHAW, 1980). Essa massa de células, que se divide rapidamente, diferencia-se formando um típico embrião, que passará pelos mesmos estágios do desenvolvimento de um embrião zigótico. O resultado final da embrionia adventícia em um óvulo que também foi fertilizado pelo processo sexual normal, é a produção de uma semente poliembriônica.

Segundo BASHAW (1980), a embrionia é um mecanismo comum da apomixia em espécies de *Citrus*, onde os embriões diferenciam-se principalmente da nucela, e devido a isso, é referido como embrionia nucelar. A embrionia também é observada em algumas gramíneas, normalmente, juntamente com a aposporia. Em espécies apomíticas de *Citrus*, processos sexuais e apomíticos podem ocorrer simultaneamente dentro de um mesmo óvulo.

PSEUDOGAMIA E DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO EM PLANTAS APOMÍTICAS

Apesar do embrião ser formado sem a união dos gametas feminino e masculino em plantas

apomíticas, segundo BASHAW (1980), a polinização é necessária em muitos apomíticos para o desenvolvimento do embrião e do endosperma. Segundo este mesmo autor, este mecanismo não é totalmente compreendido, mas é possível que funcione como um estímulo para a iniciação do desenvolvimento do embrião apomítico, como um requerimento para a maturação do embrião, ou ainda para a formação do endosperma.

Segundo KOLTUNOW (1993), o termo pseudogamia se refere à fusão dos núcleos polares do saco embrionário com o núcleo da célula espermática do gameta masculino para iniciar a formação do endosperma, sem, entretanto, ocorrer a fecundação da oosfera. Com exceção de *Hieracium*, a maioria das espécies apomíticas apospóricas são pseudógamas, ou seja, necessitam da polinização para a formação do endosperma (ASKER, 1979, 1980; NOGLER, 1984; BASHAW e HANNA, 1990). Contagens cromossômicas de células em divisão do endosperma têm confirmado a fertilização dos núcleos polares ou de um núcleo polar em algumas espécies apospóricas. O mecanismo que impede a fertilização da célula-ovo não reduzida não é conhecido em muitas espécies. Em outras, pode ser decorrente da embriogênese já ter iniciado no momento em que a pseudogamia ocorre (NOGLER, 1984), como observado em óvulos de espécies apomíticas de *Poa*, *Paspalum*, *Cenchrus* e outros gêneros de gramíneas. O endosperma, porém, não se desenvolve e o embrião não se diferencia até ocorrer a polinização. Alternativamente, a célula não reduzida pode sintetizar uma parede que age como uma barreira física para a fertilização (SAVIDAN, 1989; ASKER e JERLING, 1992). Em plantas apospóricas, onde pode ocorrer o desenvolvimento de dois ou mais embriões, o endosperma pode se desenvolver em mais de um saco embrionário, mas aparentemente esses se fusionam durante o desenvolvimento e formam um endosperma único na semente madura (KOLTUNOW, 1993).

A produção autônoma (sem polinização) do endosperma é comum entre as plantas apomíticas diplospóricas, principalmente nas Compositae (NOGLER, 1984). Os mecanismos que iniciam a formação autônoma do endosperma não são conhecidos. Endospermas produzidos na ausência de polinização, podem ter níveis de ploidia variáveis em apomíticos diplospóricos, sugerindo que a fusão

dos núcleos polares, não é um pré-requisito para a iniciação da atividade mitótica no endosperma (NOGLER, 1984; RICHARDS, 1986; BASHAW e HANNA, 1990; ASKER e JERLING, 1992). Entretanto, em algumas gramíneas diplospóricas (*Elymus*, *Poa*, *Eragrostis* e *Tripsacum*), a polinização é necessária para a produção do endosperma (BASHAW e HANNA, 1990).

No caso das plantas onde ocorre embrionia adventícia, os embriões apomíticos obtêm nutrientes a partir do endosperma formado no saco embrionário sexual.

INDICADORES E MÉTODOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DA APOMIXIA

Segundo BASHAW (1980), a determinação do modo de reprodução de uma espécie ou entidade taxonômica deve ser feito pela combinação de diferentes técnicas: a) análises citológicas da origem e subsequente desenvolvimento do saco embrionário e b) análises de progênie. CLEGG e EPPERSON (1985) citam duas maneiras para determinar o modo de reprodução baseado neste segundo critério: pela observação direta de cruzamentos (cruzamentos em condições controladas) e pela observação da distribuição dos genótipos nas famílias (testes de progênies), e ainda se referem a uma outra metodologia, que consiste na análise da biologia reprodutiva (morfologia floral, observação do comportamento do polinizador e do movimento do pólen). BASHAW (1980) ressalta que nenhum estudo isolado é conclusivo. Isto porque observações citológicas informam o tipo de apomixia, mas não indicam a frequência em que sementes assexuais são formadas em apomíticos facultativos. Ao contrário, as análises de progênie informam sobre a percentagem de indivíduos da progênie idênticos e diferentes da planta-mãe e, por isto, fornecem uma boa estimativa da frequência de apomixia, mas não revelam o mecanismo envolvido (aposporia, diplosporia ou embrionia adventícia).

NAUMOVA (1997) apresenta uma revisão de várias técnicas para a análise da ocorrência de apomixia. A seguir são apresentadas as mais comumente utilizadas.

- Estudos citológicos da megasporogênese e do desenvolvimento do saco embrionário

A análise citológica da formação e desenvolvimento do saco embrionário é o método mais clássico para determinação do modo de

reprodução de uma espécie. Este método tem a vantagem de permitir, na maioria dos casos, distinguir o tipo de apomixia presente. Entretanto, em muitas espécies a distinção entre reprodução sexual e apomítica fica dificultada pela grande semelhança entre os dois processos.

Os sacos embrionários apospóricos normalmente assemelham-se àqueles de espécies sexuais relacionadas referindo-se ao número e arranjo dos núcleos. Uma complicação adicional, é que na aposporia, a substituição do megásporo sexual por um apósporo inicial pode ser rápida e não ser detectada em análises citológicas, o que se torna ainda mais crítico em espécies onde ocorre a diferenciação de somente um saco embrionário apospórico e este apresenta o mesmo padrão de desenvolvimento do saco embrionário sexual (BASHAW, 1980). Entretanto, há a possibilidade de se distinguir entre a célula mãe de megásporo de um apósporo inicial pela posição dos mesmos na nucela, já que a célula mãe de megásporo normalmente possui uma posição definida.

Quando o número de sacos embrionários apospóricos formados é superior a um ou quando este não se assemelha ao saco embrionário sexual, normalmente pela falta das antípodas, a identificação da aposporia é relativamente fácil. Em alguns biótipos de *Paspalum*, a aposporia é facilmente distinguível, pela ausência de antípodas e pela falta de organização dentro do saco embrionário apospórico (BURSON et al., 1991). Em outras espécies, entretanto, para identificar a origem de cada saco embrionário (sexual ou apospórico) é necessário seguir o desenvolvimento de cada um, desde o início de seu desenvolvimento (BASHAW, 1980).

Na embrionia adventícia, não há a formação de sacos embrionários, entretanto um saco embrionário sexual pode se desenvolver no mesmo óvulo. A distinção entre a forma sexual e a assexual de reprodução, nestes casos, é relativamente fácil em estágios iniciais pela análise da presença ou ausência de sacos embrionários.

A identificação da diplosporia é muitas vezes dificultada pelo pequeno tamanho e estágio inicial do óvulo quando ocorre a meiose e também porque não há nenhuma alteração óbvia do saco embrionário ou do padrão de desenvolvimento do embrião. Para detectar a diplosporia, é necessário determinar se a primeira divisão da célula-mãe de megásporo é meiótica ou mitótica. Entretanto, o estágio meiótico

é difícil de ser detectado porque os três membros da tétrade linear do megásporo, próximos à micrópila, normalmente degeneram. Neste caso, é necessário observar óvulos individuais ao longo de todos os estágios de desenvolvimento, desde a diferenciação da célula mãe de megásporo até a formação do embrião maduro, dando atenção especial à presença ou ausência da tétrade linear de megásporos, à degeneração de três dos quatro megásporos durante ou logo após a meiose e à aparência das células nucleares adjacentes.

• Análises de progênie

Segundo BASHAW (1980), a análise de progênie de várias plantas submetidas à polinização aberta pode fornecer informações sobre o modo de reprodução de uma espécie, determinando a ocorrência de reprodução sexual, parcialmente sexual (facultativa) ou assexual. A análise é baseada na ocorrência ou não de segregação gênica, entre os indivíduos irmãos. As características analisadas para avaliar a ocorrência de segregação podem ser morfológicas, bioquímicas (isoenzimas) ou moleculares (DNA). Entre estas, a primeira apresenta uma desvantagem por sofrer grande influência ambiental e por não ser possível diferenciar os indivíduos homocigotos dominantes dos heterocigotos, para a(s) característica(s) em estudo.

A análise eletroforética de isoenzimas tem sido utilizada para determinar o modo de reprodução de diversas entidades taxonômicas (BROWN e ALLARD, 1970; EPPERSON e ALLARD, 1984; CAVALLI-MOLINA et al., 1989; HICKENBICK et al., 1992; AAS et al., 1994; FERREIRA e CAVALLI-MOLINA, 1994; PACE e QUALSET, 1995). Mais recentemente, análises do polimorfismo do DNA, como RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) e RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), entre outras, têm contribuído para a determinação do modo de reprodução de diferentes espécies de plantas (LEBLANC et al., 1995; ORTIZ et al., 1997; NASSAR et al., 1998).

Na apomixia obrigatória, exceção feita à diplosporia meiótica, toda a progênie é geneticamente idêntica à planta-mãe. Assim, a existência de uma progênie totalmente uniforme exclui a ocorrência de reprodução sexual por fecundação cruzada, e indica a ocorrência de apomixia obrigatória ou de autofecundação. A análise de segregação de marcadores genéticos

codominantes como isoenzimas ou marcadores de polimorfismo de DNA do tipo SSRs (regiões de repetição simples ou microssatélites) e RFLPs permitem a distinção entre estes dois tipos de reprodução, pelo fato de possibilitarem a distinção entre indivíduos homo e heterocigotos, para os locos analisados. Como a autofecundação leva progressivamente a homocigose de todos os locos e a apomixia mantém a heterocigose fixada ao longo das gerações, a análise dos padrões eletroforéticos destes marcadores codominantes permite concluir se a uniformidade observada na progênie é devida à autofecundação, porque todas as plantas são idênticamente homocigotas, ou devida à apomixia obrigatória – porque as plantas-irmãs são igualmente homocigotas para alguns locos e igualmente heterocigotas para outros locos.

Além da análise de progênie de plantas femininas submetidas à polinização aberta (como descrito acima), outra evidência de apomixia pode ser obtida através de reprodução controlada, utilizando a técnica de emasculação ou utilizando uma planta macho-estéril para evitar a autofecundação. O aparecimento de F_1 igual à planta-mãe, ao invés de F_1 heterocigota com alelos diferentes dos encontrados na planta-mãe e/ou a ausência de segregação da F_1 heterocigota sugerem apomixia (BASHAW, 1980).

Plantas apomíticas facultativas têm a capacidade de se reproduzirem tanto sexual quanto apomiticamente. Portanto, uma percentagem de seus óvulos possuem sacos embrionários sexuais, contendo células-ovo reduzidas, que podem ser fertilizadas por processos sexuais normais (KOLTUNOW, 1993). Segundo BASHAW (1980), a detecção da apomixia facultativa pode ser considerada mais difícil, mas os mesmos indicadores e princípios são aplicados. Neste caso, não se espera que a progênie seja totalmente uniforme, a não ser que a planta-mãe seja homocigota e se autofecunde. O indicador primário da apomixia facultativa é a presença, entre a progênie, de um número altamente desproporcional de descendentes idêntica à planta-mãe junto com algumas plantas, que são geneticamente diferentes. De um modo geral, a maioria dos apomíticos têm uma tendência a serem facultativos (NOGLER, 1984; ASKER e JERLING, 1992). Entretanto, BASHAW (1980) afirma que, na prática, a grande maioria das plantas apomíticas facultativas comportam-se como apomíticas obrigatórias, pois as baixas taxas de sexualidade e

o fraco vigor dos indivíduos resultantes de reprodução sexual fazem com que a progênie seja homogênea. Há evidências que o grau de obrigatoriedade da apomixia possa ser influenciado por vários fatores externos à planta-mãe, como por exemplo pelo progenitor doador do pólen (FROST e SOOST, 1968; NOGLER, 1984), fotoperíodo e temperatura (KNOX, 1967; McWILLIAM et al., 1978), sais orgânicos (GOUNARIS et al., 1991) e níveis de nutrientes (FROST e SOOST, 1968).

- Análise do número cromossômico e comportamento meiótico

Outros indicadores da apomixia baseiam-se no número cromossômico, no comportamento meiótico e na fertilidade do grupo ou entidade estudada. Segundo MUNTZING (1933), um número cromossômico constante ou uma boa produção de sementes em plantas com grande irregularidade meiótica fornece fortes evidências de apomixia. A fertilidade em plantas com meiose irregular, em triploides por exemplo, também sugere apomixia.

- Análise da frequência de plântulas gêmeas

A alta percentagem de plântulas gêmeas é indicativa de apomixia por aposporia e de embrionia adventícia, pois nestes casos pode haver a formação de um embrião sexual e um ou mais embriões apospóricos ou nucelares (BASHAW, 1980).

- Análise de marcadores morfogenéticos específicos

Segundo BARCACCIA (1995), em estágios específicos da reprodução das plantas, marcadores morfogenéticos, tal como a calose, podem indicar a ocorrência de reprodução sexual ou assexual. A calose é um componente característico de várias células vegetais, sendo sintetizada e depositada na parede celular (PEEL et al., 1997). KOLTUNOW (1993) cita que, em espécies de reprodução sexual, antes da meiose iniciar, uma parede de calose forma-se em torno de cada célula-mãe de micrósporo na antera e, em torno da célula-mãe de megásporo no óvulo. A razão deste isolamento físico ainda não é claro, mas há uma possibilidade de que a calose protegeria essas células dos sinais da diferenciação somática (WYLIE et al., 1985), como da ação de hormônios ou outros componentes da nucela ou do tapeto, que se difundiriam e interromperiam a meiose (RODKIEWICZ, 1970; BOUMAN, 1984; CARMAN et al., 1991). Numa fase mais adiantada da megasporogênese, somente o megásporo, que originará o saco embrionário do tipo sexual, não é rodeado por calose. Os outros três megásporos, que degeneram, possuem a parede de calose. Assim, a

principal função da calose durante a megasporogênese parece ser a de suprimir o desenvolvimento dos megásporos não funcionais pelo isolamento, assegurando que somente o megásporo funcional participe da megagametogênese (WEBB e GUNNING, 1990). Na microgametogênese, cada micrósporo resultante da meiose mantém a parede de calose, mas esta é em seguida digerida por enzimas sintetizadas pelas células do tapeto, permitindo então que cada célula sofra mitoses para a formação de um grão de pólen. O padrão de deposição de calose, observado em óvulos de espécies sexuais, não ocorre durante a formação de sacos embrionários apomíticos. Em espécies apospóricas, a parede de calose não é observada em torno dos apósporos iniciais (WILLEMSE e NAUMOVA, 1992), o que é consistente pelo fato deles sofrerem mitoses para formar o saco embrionário apospórico. Segundo KOLTUNOW (1993), em espécies apospóricas tais como *Poa*, em que a célula-mãe de megásporo se diferencia na nucela, mas depois degenera, uma parede de calose incompleta é observada ao redor da célula mãe de megásporo.

CARMAN et al. (1991) citam que a célula mãe de megásporo, que originará o saco embrionário diplospórico, também não possui parede de calose.

NAUMOVA (1997) acredita que esta técnica de análise de deposição de calose em torno das células envolvidas, na formação de sacos embrionários seja mais útil para a detecção da diplosporia, já que não há uma total regularidade na ausência de calose em apósporos iniciais (algumas espécies apospóricas apresentam deposição de calose nas paredes dos apósporos iniciais).

- Teste de auxina

MATZK (1991,a) propõe uma técnica rápida para diferenciar oosferas capazes de sofrerem partenogênese [tipo raro de apomixia em que o embrião se desenvolve diretamente do núcleo reduzido da oosfera (BASHAW, 1980)]: o teste de auxina. Este teste é baseado na hipótese de que uma única aplicação de auxina sintética na inflorescência, poucos dias antes da antese, induz a oosfera a se desenvolver sem fertilização. Nas sementes desenvolvidas, induzidas por auxina, o endosperma está ausente devido à falta de fertilização. O autor salienta que a oosfera, que consegue se desenvolver sem fertilização, possui a capacidade de reprodução assexual. Em oposto, a cariopse induzida será vazia

no caso da oosfera não responder ao estímulo da auxina, mostrando uma incapacidade do genótipo de seguir a rota assexual de reprodução. Segundo MATZK (1991, a), é razoável pensar que a frequência de partenogênese possa fornecer uma estimativa do potencial assexual do genótipo, já que ela é um dos passos na produção assexual da semente. MAZZUCATO et al. (1996) utilizaram o teste de auxina para avaliar a frequência de partenogênese, e indiretamente estimar o potencial apomítico, de oito genótipos de *Poa pratensis* e compararam esta técnica com métodos alternativos, como análises de saco embrionário e testes de progênie utilizando características morfológicas e isoenzimáticas, concluindo que o teste de auxina é um método eficiente, para avaliar a ocorrência de apomixia em programas de melhoramento.

GENÉTICA DA APOMIXIA

A apomixia não é um processo estimulado aleatoriamente por fatores nutricionais e ambientais. Ao contrário, tem sido mostrado que a capacidade de se reproduzir apomiticamente é geneticamente controlada, o que é de grande importância para o melhoramento de espécies apomíticas, pois possibilita a manipulação deste modo de reprodução em programas de melhoramento. O procedimento empregado, para determinação do controle genético da apomixia, tem sido o cruzamento de plantas apomíticas com plantas sexuais relacionadas, observando-se o modo de reprodução das gerações F_1 e F_2 e de retrocruzamentos (ASKER, 1979). A planta apomítica, nestes casos, é utilizada como doadora de pólen, já que, via de regra, produz gametas masculinos normalmente reduzidos.

Estudos conduzidos em diferentes espécies têm indicado que este modo de reprodução é controlado por poucos genes: um único gene dominante nas espécies apospóricas *Pennisetum*, *Panicum* e *Ranunculus* (ASKER e JERLING, 1992), um gene na espécie apospórica facultativa *Poa pratensis* L. (BARCACCIA et al., 1998), dois genes com interações epistáticas na apospórica *Cenchrus cilliales* (TALIAFERRO e BASHAW, 1966), três genes recessivos em *Parthenium argentatum* (POWERS, 1945), um gene dominante controlando a apomixia e genes reguladores, determinando a expressão facultativa deste modo de reprodução no biótipo anteras roxas de *Paspalum dilatatum* (BURSON, 1991, 1992).

ARTHUR et al. (1993) isolaram um mutante recessivo (fs = fêmea estéril) em *Pennisetum glaucum*, induzido por radiação (HANNA e POWELL, 1974). A ausência de tecido sexual no quinto dia após a polinização e a presença de sacos embrionários apospóricos sugerem que o gene fs representa um possível passo no processo desenvolvimental apospórico.

Muito pouco é conhecido em relação à herança da diplosporia, onde os mecanismos para o desenvolvimento de um embrião apomítico, são totalmente diferentes da aposporia. Neste caso, a meiose é de algum modo reprimida e a célula-mãe de megásporo não reduzida é estimulada a formar um saco embrionário por divisões mitóticas. Segundo BASHAW (1980), os poucos dados existentes sugerem uma herança simples para o controle da diplosporia. Em *Taraxacum*, MOGIE (1988) sugere a existência de um único loco e propõe um modelo, onde o gene responsável pela diplosporia seria um gene sexual mutado, que impediria a redução meiótica. Estudos de mutagênese em espécies sexuais de *Arabidopsis* têm mostrado que é possível induzir eventos similares a algumas etapas do processo apomítico (CHAUDHURY e PEACOCK, 1994; CHAUDHURY et al., 1997; OHAD et al., 1996).

A embriônia nucelar em *Citrus* parece ser controlado por um loco dominante, segundo PARLEVLIET e CAMERON (1959) e IWAMASA et al. (1967), ou por um ou dois genes, de acordo com CAMERON e SOOST (1980).

Entretanto, GRIMANELLI et al. (1998) sugerem que o modelo de herança monogênica para a apomixia necessita de mais análises: qualquer que seja o número de genes envolvidos, eles podem comportar-se como um loco único por formarem um grupo de ligação. Os dados obtidos por estes autores em *Tripsacum*, uma espécie diplospórica, não fornecem provas da existência de vários genes, mas sugerem a possibilidade de um grupo de ligação co-adaptado. Então, segundo estes autores, análises de segregação convencional em apomíticos não é suficiente para concluir que o modelo de um único gene esteja correto.

Como a maioria das plantas poliplóides são apomíticas, THOMPSON e LUMARET (1992) sugerem que esta estreita relação pode ser devida a diferentes efeitos genéticos, como o efeito de dosagem do gene. Assim, quanto mais alto o nível de ploidia da planta mais cópias do(s) gene(s)

responsável(eis) pela apomixia existirão e maior será a probabilidade da mesma ser apomítica.

Segundo KOLTUNOW (1993), em espécies apomíticas, o(s) gene(s) responsável(is) pela apomixia iniciariam a formação do megagametófito (saco embrionário) mitótico e o desenvolvimento autônomo do embrião e do endosperma. Uma vez que estes eventos sejam iniciados na nucela, os passos subsequentes ocorreriam através dos mesmos processos, que ocorrem durante a reprodução sexual. Ou seja, após o(s) gene(s) apomítico(s) ter(em) iniciado o desenvolvimento do embrião sem fertilização, os genes que controlam a formação do embrião, sua estrutura e padrão de formação são provavelmente os mesmos necessários para o desenvolvimento do embrião sexual. A expressão regional e/ou célula-específica dos genes apomíticos e sexuais em células da nucela determinariam se ocorreriam os processos sexuais, apomíticos ou ambos. O mesmo autor apresenta diferentes modelos de controle genético para a apomixia, entre eles o modelo de PEACOCK (1992), que sugere um modelo de ação de um gene dominante em espécies apospóricas. Nesse modelo, o produto do gene apomítico é considerado como um componente normal da maturação sexual, sendo provavelmente um ativador transcricional, que normalmente se liga ao(s) promotor(es) de gene(s) que age(m) precocemente, e que leva(m) a formação de uma cascata desenvolvimental necessária para a formação do saco embrionário. Em sistemas sexuais, esse gene indutor de formação do saco embrionário seria normalmente expresso no megásporo após a meiose. A aposporia resultaria então, da expressão precoce daquela proteína ou de sua expressão num grupo de células nucelares, nas quais não seria normalmente expressa em sistemas sexuais. Cada uma dessas células responderia ao fator de transcrição para produzir um saco embrionário não reduzido. Entretanto, KOLTUNOW (1993) afirma que esse modelo é vago, não explicando como se formam o embrião e o endosperma. De qualquer modo, SHISHKINSKAYA (1995) enfatiza que o controle da apomixia é realizado em nível de processos regulatórios da expressão gênica. Assim, o controle seria mais complexo e incluiria, por um lado, genes reguladores e estruturais em comum com a reprodução sexual e, por outro lado, genes específicos da apomixia.

Até o momento os genes envolvidos na apomixia não foram isolados, só seus produtos é

que foram identificados, mas suas funções permanecem desconhecidas. Nenhuma hipótese a respeito da natureza do produto de um gene apomítico e, do seu modo de ação explicam satisfatoriamente como poucos genes dominantes são necessários para levar à formação do megagametófito por mitose e à formação do embrião e do endosperma sem fertilização (KOLTUNOW, 1993).

Embora hajam controvérsias, os dados disponíveis sugerem que a apomixia é controlada por poucos genes, mas os efeitos destes genes são profundos: eles direcionam uma célula somática a formar um saco embrionário sem meiose e à formação do embrião e do endosperma sem fertilização. O fato da apomixia ter uma base genética simples é uma vantagem pois, facilita a sua manipulação em nível de melhoramento genético.

A APOMIXIA E O MELHORAMENTO

Uma das principais vantagens da apomixia é possibilitar a imediata fixação de qualquer genótipo superior, selecionado no processo de melhoramento, permitindo que o mesmo origine plantas idênticas, independente do seu grau de heterozigose (KOLTUNOW et al., 1995). O melhoramento de plantas apomíticas pode ser realizado através de cruzamentos entre uma espécie apomítica e outra espécie sexual relacionada. Em espécies apomíticas nas quais existem ecótipos ou biótipos sexuais, o processo é facilitado, promovendo-se o cruzamento entre o biótipo apomítico superior (doador do pólen) e o biótipo sexual. As plantas apomíticas obrigatórias selecionadas a cada geração, representariam novos cultivares. No caso de plantas com apomixia facultativa, os esforços devem ser concentrados no sentido de aumentar a frequência da apomixia pelo intercruzamento das plantas, com níveis mais altos de apomixia.

As mesmas vantagens da apomixia podem ser obtidas, através da propagação vegetativa de um genótipo superior. Entretanto, a propagação vegetativa favorece o acúmulo de doenças bacterianas e virais, que reduzem a produtividade e podem levar à extinção de genótipos superiores. Em batata, por exemplo, a utilização da apomixia apresentaria a vantagem de combinar a uniformidade com a "filtragem" de vírus (HERMSEN, 1980). Além disto, HANNA (1995) salienta que a propagação de um genótipo, via semente, por

apomixia, reduz grandemente a estocagem, o transporte e os custos de plantio, quando comparados com a propagação vegetativa.

Entretanto, apesar das vantagens da apomixia, ela pode representar um entrave no melhoramento de espécies apomíticas. Em *Poa pratensis*, por exemplo, a baixa frequência de hibridação entre biótipos, decorrente da maioria ser apomítico, torna ineficiente as tentativas de melhoramento, sendo que há grande esforço no intuito de se superar a apomixia desta espécie (MATZK, 1991, b). Já no caso da apomixia facultativa, a desvantagem está na falta de estabilidade do cultivar e na influência do polinizador e das condições ambientais sobre o modo de reprodução predominante, o que torna mais imprevisível o comportamento reprodutivo da planta (ASKER, 1979).

Do mesmo modo que a apomixia pode facilitar o melhoramento de espécies que apresentam este modo de reprodução, esta também pode facilitar o melhoramento de espécies sexuais pela incorporação da apomixia. Por isso, em várias culturas de importância econômica, esforços têm sido concentrados no sentido de introduzir a apomixia na espécie de interesse. Primeiramente, o mais lógico seria descobrir, se esta característica já não está disponível no conjunto gênico da espécie de interesse (em outras raças ou populações, por exemplo). Se este não for o caso, então o procedimento deve ser a transferência da apomixia, através de cruzamentos com uma espécie relacionada que apresente este modo de reprodução. O sucesso da transferência depende de vários fatores, como a distância genética entre as espécies, diferentes níveis de ploidia, etc. No caso de não haver possibilidade de transferência da apomixia por cruzamentos, há a possibilidade de introduzi-la através da indução de mutações ou por engenharia genética (ASKER e JERLING, 1992). Em cevada e em batata, por exemplo, onde não se conhece nenhum parente apomítico, BOTHMER et al. (1988) sugerem a possibilidade de obtenção de plantas apomíticas através da indução de mutações. HU et al. (1991) discutem a utilização da indução química da apomixia em diferentes espécies vegetais, como o milho e a batata.

Devido ao grande interesse na transferência da apomixia para diferentes culturas, tem se procurado mapear o(s) gene(s) envolvido(s) na apomixia em diferentes espécies (GRIMANELLI et al., 1995; GRIMANELLI et al., 1998; PERSSON e NYBOM, 1998; PESSINO et al., 1998; CHEN et al., 1999).

A descoberta de marcadores moleculares associados ao(s) gene(s) de apomixia facilitaria não só a transferência deste(s) gene(s), como também o acompanhamento da segregação desta característica nas gerações seguintes.

CONCLUSÕES

A apomixia tem obtido grande atenção nos últimos anos. Este fato é devido principalmente ao melhor entendimento deste tipo de reprodução, de seus mecanismos e de sua genética, o que facilita a manipulação desta característica no melhoramento de plantas.

O fato de processos sexuais e apomíticos coexistirem dentro de um mesmo óvulo e entre óvulos de um mesmo indivíduo indica que a sexualidade e a apomixia não são modos de reprodução mutualmente exclusivos. Por isso, KOLTUNOW (1993) acredita que apomíticos não se originam simplesmente através de combinações de mutações do processo sexual. Ou seja, a apomixia e a sexualidade podem ser fenômenos simultâneos ou interdependentes. Atualmente, acredita-se que a apomixia e a sexualidade existam em um estado de balanço em plantas apomíticas. Entretanto, ainda há muitas controvérsias quanto ao seu controle genético. Os trabalhos realizados, até o momento, mostram que a genética desta característica pode diferir entre espécies, principalmente em relação ao número de genes envolvidos. A maioria dos trabalhos cita esta característica como sendo de herança simples (um ou dois genes dominantes), mas há autores que apoiam modelos de grupos de ligação ou que seu controle ocorreria em nível de processos regulatórios da expressão gênica, o que acarretariam um controle mais complexo. Enfim, isso indica a necessidade de estudos deste modo de reprodução, em diferentes espécies, a fim de facilitar o entendimento deste processo e proporcionar a sua utilização em programas de melhoramento genético.

BIBLIOGRAFIA CITADA:

- AAS, G.; MAIER, J.; BALTISBERGER, M.; MEETZGER, S. Morphology, isozyme variation, cytology, and reproduction of híbridos between *Sorbus aria* (L) Crantz and *S. torminalis* (L) Crantz. *Botanica Helvetica*, Basel, v. 104, p.195-214, 1994.
- ARTHUR, L.; OZIAS-AKINS, P.; HANNA, W.W. Female sterile mutant in pearl millet: evidence for initiation of apospory. *The Journal of Heredity*,

- New York, v. 84, p.112-115, 1993.
- ASKER, S. Progress in apomixis research. **Hereditas**, Landskrona, v. 91, p. 231-240, 1979.
- ASKER, S. Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation. **Hereditas**, Landskrona, v. 93, p.277-293, 1980.
- ASKER, S.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 298p.
- BARCACCIA, G. Callose localization in cell walls in meiotic and apomeiotic megasporogenesis in diploid alfafa. **Apomixis Newsletter**, Paris, n.8, p.34-35, 1995.
- BARCACCIA, G.; MAZZUCATO, A.; ALBERTINI, E.; ZETHOF, J.; GERATS, A.; PEZZOTI, M.; FALCINELLI, M. Inheritance of parthenogenesis in *Poa pratensis* L.: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p.74-82, 1998.
- BASHAW, E.C. Apomixis and sexuality in buffelgrass. **Crop Science**, Madison, v. 2, p.412-415, 1962.
- BASHAW, E.C. Apomixis and its application in crop improvement. In: FEHR, W.R.; HADLEY, H.H. **Hybridization of Crop Plants**. Madison: American Society of Agronomy, 1980. Cap. 3, p.45-63.
- BASHAW, E.C.; HANNA, W.W. Apomitic reproduction. In: CHAPMAN, G.P. **Reproductive versatility in the grasses**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p.100-130.
- BOUMAN, F. The ovule. In: JOHRI, B.M. **Embryology of Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p.123-157.
- BOTHMER, R. von; BENGTTSSON, M.; FLINK, J.; LINDE-LAURSEN, I. Complex interspecific hybridization in barley (*Hordeum vulgare* L.) and the possible occurrence of apomixis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 76, p.681-690, 1988.
- BROWN, A.D.H.; ALLARD, R.W. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. **Genetics**, Baltimore, v.66, p.133-145, 1970.
- BRUCK, D.K.; WALKER, D.B. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jarmbhiri*. I. Ontogeny of the epidermis. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 146, p.188-195, 1985.
- BURSON, B.L. Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 152, p.219-223, 1991.
- BURSON, B.L. Apomixis in *Paspalum*. In: APOMIXIS WORKSHOP, 1992, Atlanta. **Proceedings...** Atlanta: US Department of Agriculture - Agriculture Research Service, 1992. p.11-12.
- BURSON, B.L.; VOIGT, P.W.; EVERS, G.W. Cytology, reproductive behavior and forage potential of hexaploid dallisgrass biotypes. **Crop Science**, Madison, v. 31, p.636-641, 1991.
- CAMERON, J.W.; SOOST, R.K. Mono- and polyembryony among tetraploid *Citrus* hybrids. **Hortscience**, Alexandria, v. 15, p.730-731, 1980.
- CARMAN, J.G.; CRANE, C.F.; RIERA-LIZARAZU, O. Comparative histology of cell walls during meiotic and apomeiotic megasporogenesis in two hexaploid Australian *Elymus* species. **Crop Science**, Madison, v. 31, p.1527-1532, 1991.
- CAVALLI-MOLINA, S.; MOTTA, V.E.P.; SCHIENGOLD, M.; WINGE, H. Identical isoenzyme patterns in sib plants of *Relbunium hypocarpium* (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 12, p.361-368, 1989.
- CHAUDHURY, A.M.; PEACOCK, J.W. Isolating apomictic mutants in *Arabidopsis thaliana*: prospects and progress. In: KHUSH, G.S. **Apomixis: exploiting hybrid vigour in rice**. Los Banos: International Rice Research Institute, 1994. p.66-71.
- CHAUDHURY, A.M.; LUO, M.; MILLER, C.; GRAIG, S.; DENNIS, S.E.; PEACOCK, W.J. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 94, p.4223-4228, 1997.
- CHEN, L.Z.; MIYAZAKI, C.; KOJIMA, A.; SAITO, A.; ADACHI, T. Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 154, p.55-62, 1999.
- CLEGG, M.T.; EPPERSON, B.K. Recent developments in population genetics. **Advanced Genetics**, San Diego, v. 23, p.235-269, 1985.
- DARLINGTON, C.D. **The evolution of genetic systems**. Cambridge: University Press, 1939, 149p.
- EPPERSON, B.K.; ALLARD, R.W. Allozyme analysis of the mating system in lodgepole pine populations. **The Journal of Heredity**, New York, v. 75, p.212-214, 1984.
- FERREIRA, C.A.S.; CAVALLI-MOLINA, S. Self-fertilization and absence of heterozygotes in *Hordeum euclaston* (Gramineae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 17, p.89-95, 1994.
- FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed reproduction development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. **The Citrus Industry**, v.II. Berkeley: University of California Press, 1968. p.290-324.
- GOUNARIS, E.K.; SHERWOOD, R.T.; GOUNARIS, I.; HAMILTON, R.H.; GUSTINE, D.L. Inorganic salts modify embryo sac development in sexual and aposporous *Cenchrus ciliaris*. **Sexual Plant Reproduction**, Heidelberg, v. 4, p.188-192, 1991.

- GRIMANELLI, D.; LEBLANC, O.; GONZÁLES-de-LEÓN, D.; SAVIDAN, Y. Mapping apomixis in tetraploid *Tripsacum*, preliminary results. **Apomixis Newsletter**, Paris, n.8, p.33-39, 1995.
- GRIMANELLI, D.; LEBLANC, O.; ESPINOSA, E.; PEROTTI, E.; GONZÁLES-de-LEÓN, D.; SAVIDAN, Y. Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes? **Heredity**, Harlow, v. 80, p.40-47, 1998.
- HANNA, W.W. Use of apomixis in cultivar development. **Advances in Agronomy**, v. 54, p.333-350, 1995.
- HANNA, W.W.; BASHAW, E.C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, Madison, v. 27, p.1136-1139, 1987.
- HANNA, W.W.; POWELL, J.B. Stubby head, an induced facultative apomictic in pearl millet. **Crop Science**, Madison, v. 13, p.726-728, 1973.
- HANNA, W.W.; POWELL, J.B. Radiation-induced female-sterile mutant in pearl millet. **The Journal of Heredity**, New York, v. 65, p.247-249, 1974.
- HANNA, W.W.; POWELL, J.B.; MILLOT, J.C.; BURTON, G.W. Cytology of obligate sexual plants in *Panicum maximum* Jacq. and their use in controlled hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 13, p.695-697, 1973.
- HERMSEN, J.G. Breeding for apomixis in potato: pursuing an utopian scheme. **Euphytica**, Dordrecht, v. 29, p.595-607, 1980.
- HICKENBICK, M.C.M.; FLORES, P.F.; CAVALLI-MOLINA, S.; WEBER, L.H.; KERSTING, A.C.O.; COSTA, L.S.; SOUZA-CHIES, T.T. de; ALBARUS, M.H. Mode of reproduction and seed production in *Paspalum dilatatum* Poir Virasoro biotype - Dilatata Group (Gramineae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 15, p.85-102, 1992.
- HU, G.; LIANG, G.H.; WASSOM, C.E. Chemical induction of apomictic seed formation in maize. **Euphytica**, Dordrecht, v. 56, p.97-105, 1991.
- IWAMASA, M.; UENO, I.; NISHIURA, M. Inheritance of nucellar embryony in *Citrus*. **Bulletin Horticultural Research Station Ser. B**, Shiguoka, v. 7, p.1-8, 1967.
- KNOX, R.B. Apomixis: seasonal and population differences in a grass. **Science**, Washington, v. 157, p.325-326, 1967.
- KOLTUNOW, A.M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p.1425-1437, 1993.
- KOLTUNOW, A.M.; BICKNELL, R.A.; CHAUDHURY, A.M. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 108, p.1345-1352, 1995.
- LEBLANC, O.; GRIMANELLI, D.; GONZÁLES-de-LEÓN, D.; SAVIDAN, Y. Detection of the apomictic mode of reproduction in maize -*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, p.1198-1203, 1995.
- MATZK, F. A novel approach to differentiate embryos in the absence of endosperm. **Sexual Plant Reproduction**, Heidelberg, v. 4, p.88-94, 1991a.
- MATZK, F. New efforts to overcome apomixis in *Poa pratensis* L. **Euphytica**, Dordrecht, v. 55, p.65-72, 1991b.
- MAZZUCATO, A.; den NIJS, A.P.M.; FALCINELLI, M. Estimation of parthenogenesis frequency in Kentucky bluegrass with auxin-induced parthenocarpic seeds. **Crop Science**, Madison, v. 36, p.9-16, 1996.
- McWILLIAM, J.R.; SHANKER, K.; KNOX, R.B. Effects of temperature and photoperiod on growth and reproductive development in *Hyparrhenia hirta*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 21, p.557-569, 1978.
- MOGIE, M. A model for the evolution and control of generative apomixis. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 35, p.127-154, 1988.
- MUNTZING, A. Apomictic and sexual seed formation in *Poa*. **Hereditas**, Landskrona, v. 26, p.115-190, 1933.
- NASSAR, N.M.A.; VIEIRA, M.A.; VIEIRA, C.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular and embryonic evidence of apomixis in cassava interspecific hybrids (*Manihot* spp.). **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 78, p.349-352, 1998.
- NAUMOVA, T.N. Apomixis in tropical fodder crops: cytological and functional aspects. **Euphytica**, Dordrecht, v. 96, p.93-99, 1997.
- NOGLER, G.A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, B.M. **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p.475-519.
- OHAD, N.; MARGOSSIAN, L.; HSU, Y.C.; WILLIAMS, C.; REPETH, P.; FISHER, R.L. A mutation that allows endosperm development without fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 93, p.5319-5324, 1996.
- ORTIZ, J.P.A.; PESSINO, S.C.; LEBLANC, O.; HAYWARD, M.D.; QUARÍN, C.L. Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p.850-856, 1997.
- PACE, C.D.; QUALSET, C.O. Mating system and genetic differentiation in *Dasyphyrum villosum* (Poaceae) in Italy. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 197, p.123-147, 1995.
- PARLEVLIET, J.E.; CAMERON, J.W. Evidence on inheritance of nucellar embryony in *Citrus*. **Proceedings of the American Society**

- Horticultural Science**, Alexandria, v. 74, p.252-260, 1959.
- PEACOCK, W.J. Genetic engineering and mutagenesis for apomixis in rice. **Apomixis Newsletter**, Paris, v. 4, p.3-7, 1992.
- PEEL, M.D.; CARMAN, J.G.; LEBLANC, O. Megasporeocyte callose in apomictic buffelgrass, Kentucky bluegrass, *Pennisetum squamulatum* Fresen, *Tripsacum* L., and weeping lovegrass. **Crop Science**, Madison, v. 37, p.724-732, 1997.
- PERSSON, H.A.; NYBOM, H. Genetic sex determination and RAPD marker segregation in the dioecious species sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). **Hereditas**, Landskrona, v.129, p.45-51, 1998.
- PESSINO, S.C.; EVANS, C.; ORTIZ, J.P.A.; ARMSTEAD, I.; VALLE, C.B. do, HAYWARD, M.D. A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. **Hereditas**, Landskrona, v. 128, p.153-158, 1998.
- POWERS, L. Fertilization without reduction in guayule (*Parthenium argentatum* Gray) and a hypothesis as to the evolution of apomixis and polyploidy. **Genetics**, Baltimore, v. 30, p.323-346, 1945.
- RICHARDS, A.J. **Plant Breeding Systems**. London: George, 1986, p.403-456.
- RODKIEWICZ, B. Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. **Planta**, Heidelberg, v. 93, p.39-47, 1970.
- SAVIDAN, Y.H. Another working hypothesis for the control of parthenogenesis in *Panicum maximum*: The egg cell wall completion hypothesis. **Apomixis Newsletter**, Paris, n.1, p.47-51, 1989.
- SHISHKINSKAYA, N.A. Some results of apomixis investigation in cereals. **Apomixis Newsletter**, Paris, n.8, p.21, 22, 1995.
- TALIAFERRO, C.M.; BASHAW, E.C. Inheritance and control of obligate apomixis in breeding buffelgrass, *Pennisetum ciliare*. **Crop Science**, Madison, v. 6, p.473-476, 1966.
- THOMPSON, J.D.; LUMARET, R. The evolutionary dynamics of poliploid plants: origins, establishment and persistence. **Evolution**, Lawrence, v. 7, p.302-306, 1992.
- WEBB, M.C.; GUNNING, B.E.S. Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*. **Sexual Plant Reproduction**, Heidelberg, v. 3, p.244-256, 1990.
- WILLEMSE, M.T.M.; NAUMOVA, T. Apomitic genes and seed plant reproduction. **Apomixis Newsletter**, Paris, n.5, p.19-32, 1992.
- WILMS, H.J.; van WENT, J.L.; CRESTI, M.; CIAMPOLINI, F. Adventive embryogenesis in *Citrus*. **Caryologia**, Florence, v.36, p.65-78, 1983.
- WYLIE, C.C.; HEASMAN, J.; SNAPE, A.; O'DRISCOLL, M.; HOLWILL, S. Primordial germ cells of *Xenopus laevis* are not irreversibly determined early in development. **Developmental Biology**, Duluth, v. 112, p.66-72, 1985.