



**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E
MORFOLÓGICA DE HÍBRIDOS DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta*)**

CRISTIANE ALMEIDA NOLASCO

2011

CRISTIANE ALMEIDA NOLASCO

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MORFOLÓGICA DE
HÍBRIDOS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:

Prof. D.Sc. Cláudio Lúcio Fernandes
Amaral

Co-orientadora:

Profª D. Sc. Eliane Marisa Dortas Maffei

VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA - BRASIL
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Área de Concentração em Fitotecnia

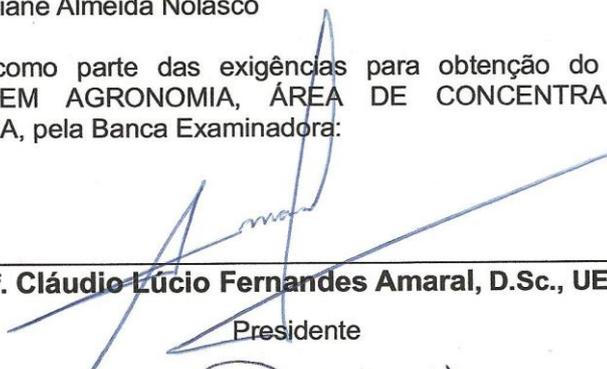
Campus de Vitória da Conquista - BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MORFOLÓGICA DE HÍBRIDOS DE MANDIOCA** (*Manihot esculenta*)”

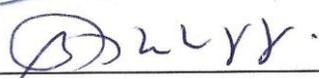
Autor: Cristiane Almeida Nolasco

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela Banca Examinadora:

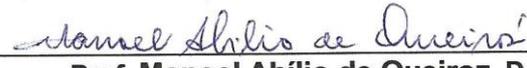


Prof. Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, D.Sc., UESB

Presidente



Prof. Alcebiades Rebouças São José, D.Sc., UESB



Prof. Manoel Abílio de Queiroz, D.Sc., UNEB

Data de realização: 30 de setembro de 2011.

Estrada do Bem Querer, Km 4 – Caixa Postal 95 – Telefone: (77) 3425-9383 – Fax: (77) 3424-1059 – Vitória da Conquista – BA – CEP: 45031-900
e-mail: mestradoagronomia@uesb.edu.br

Dedico

À minha família, amigos e professores, pelo constante incentivo, amor, carinho e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus Todo Poderoso, pela oportunidade da vida, pelas pessoas maravilhosas que fazem parte dela e por mais uma etapa concretizada;

À minha mãe Euleni Almeida Meira, por todo amor, compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida;

Ao meu filho, pelos momentos de descontração e felicidade;

À coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, que tanto se dedicam pela qualidade do curso oferecido;

Ao Prof. Dr. Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, pela orientação, compreensão, profissionalismo e por todo ensinamento e apoio.

À Prof^a.Dra. Eliane Marisa Dortas Maffei, pela oportunidade oferecida desde a graduação, profissionalismo, compreensão, apoio, incentivo e co-orientação recebida;

Ao Prof. Sandro Lopes, pela atenção, doação do material vegetativo e reprodutivo, para realização deste estudo, e informações sobre a mandioca;

À Adriana, obrigada pelo apoio e informações prestadas;

Aos colegas do Laboratório de Citogenética: Bruno, Gabriela e Luana, por terem tão amistosamente doado seu tempo e atenção;

Aos membros da Banca, Prof. Dr. Manoel Abílio Queiroz e Prof.Dr. Alcebíades Rebouças São José, pela atenção e pelas generosas contribuições;
e

Aos colegas e também amigos do curso, pela parceria, em especial, à Gabriela e Marcela, amigas para a vida.

RESUMO

NOLASCO, C. A. **Caracterização citogenética e morfológica de híbridos de Mandioca (*Manihot esculeta*)**. Vitória da Conquista-BA: UESB, 2011. 47 p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)*

A mandioca é uma planta originária da América do Sul. Destaca-se como fonte de carboidrato muito utilizada. Considerada uma espécie diplóide, possuindo $2n=36$ cromossomos e $X=9$. A análise cariotípica em células meióticas possibilita a identificação dos polimorfismos cromossômicos numéricos ou estruturais. Assim, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar citogeneticamente e morfológicamente seis híbridos de mandioca da coleção do Banco de germoplasma da UESB, em Vitória da Conquista - BA, a fim de obter informações sobre possíveis irregularidades meióticas e infertilidades que poderiam ter significado para o melhoramento destes. Para o estudo da meiose, foram coletados botões florais jovens e colocados diretamente em fixador Carnoy por 24 h, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os botões foram lavados em água destilada, hidrolisados em HCl 1N. Em seguida, as lâminas foram preparadas de acordo com a metodologia de Guerra (1983), coradas com Giemsa a 3%, e analisadas sob microscopia óptica. Para análise de viabilidade, os grãos de pólen foram corados e observados ao microscópio óptico e a caracterização fenotípica foi realizada utilizando os descritores morfológicos. Os resultados mostraram uma divisão celular com algumas anormalidades, tais como formação de tríade, células binucleadas, gametas não reduzidos e citomixia, que no híbrido 2009.48, apresentou em maior frequência. A viabilidade polínica foi considerada alta nos híbridos 2009.02 e 2009.61, média nos híbridos 2009.25, 2009.30 e 2009.57 e baixa no híbrido 2009.48, demonstrando que as irregularidades meióticas observadas comprometeram a viabilidade deste genótipo. Os descritores morfológicos apontam a existência de divergência genética entre os híbridos.

Palavras-chave: Citogenética, viabilidade polínica, citomixia.

* Orientador: Cláudio Lúcio F. Amaral, *D.Sc.*, UESB e Co-orientador: Eliane Marisa Dortas Maffei, *D.Sc.*, UESB.

ABSTRACT

Nolasco, C. A. Morphological and cytogenetic characterization of hybrids of cassava (*Manihot esculenta*). Vitória da Conquista, Bahia: UESB, 2011. 47 p. (Dissertation - Master of Agronomy, Crop Science Area of Concentration) *

Cassava is a plant originally from South America. It stands out as a source of carbohydrate widely used. Considered a diploid species, having $2n = 36$ chromosomes and $X = 9$. The karyotype analysis of meiotic cells enables the identification of numerical or structural chromosomal polymorphisms. Thus, this study aims to characterize morphologically and cytogenetically six hybrids of cassava germplasm collection of the bank of UESB in Vitória da Conquista - BA in order to obtain information about possible infertility and meiotic irregularities that could have significance for the improvement of these. For the study of meiosis, young flower buds were collected and placed directly in Carnoy fixative for 24 h at -20°C . The buttons were washed in distilled water, hydrolyzed in 1N HCl. Then the slides were prepared in accordance with the methodology of Guerra (1983), stained with 3% Giemsa and examined under light microscopy. For analysis of viability, pollen grains were stained and observed by optical microscopy and phenotypic characterization was performed using morphological descriptors. The results showed some abnormalities in cell division, such as formation of the triad, binucleated cells, and cytomixis unreduced gametes, which in the 2009.48 hybrid presented more frequently. Pollen viability was considered high in hybrids 2009.02 and 2009.61, 2009.25 average in hybrids, 2009.30 2009.57 and 2009.48 and low in the hibrid, demonstrating that the observed meiotic irregularities compromised the viability of this genotype. The morphological descriptors indicate the existence of genetic divergence among hybrids.

Keywords: Cytogenetics, pollen viability, cytomixis.

* Adviser: Cláudio Lúcio F. Amaral, *D.Sc.*, UESB e Coadvises: Eliane Marisa Dortas Maffei, *D.Sc.*, UESB

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A Inflorescência de <i>M. esculenta</i>	25
Figura 1B Botões florais de <i>M. esculenta</i>	25
Figura 1C Inflorescência de <i>M. esculenta</i>	25
Figura 1D Coloração em Grão de Pólen	25
Figura 2A Prófase I normal	26
Figura 2B Metáfase normal	26
Figura 2C Anáfase normal	26
Figura 2D Telófase I normal.....	26
Figura 2E Prófase II normal.....	26
Figura 2E Tétrade normal.....	26
Figura 3 Bivalentes em meiose.....	27
Figura 4 Não disjunção cromossômica na anáfase.....	28
Figura 5 Tétrade anormal com célula binucleada.....	28
Figura 6 Tétrade com célula trinucleada.....	29
Figura 7A Tríade.....	29
Figura 7B Tétrade com célula binucleada.....	29
Figura 8A Ponte anafásica.....	30
Figura 8B Políade.....	30
Figura 8C Cromossomo retardatário	30
Figura 8D Tríade com célula anucleada.....	30
Figura 9 Tríades com gameta não reduzidos.....	31
Figura 10 Citomixia no H2009.48.....	31
Figura 11 Citomixia no H2009.61.....	32
Figura 12 Citomixia em grãos de pólen 2009.02, 2009.25 e 2009.57	33
Figura 13A Grão de pólen viável	35
Figura 13B Grão de pólen aberto	35
Figura 13C Grão de pólen inviável	35
Figura 13D Grão de pólen inviável	35
Figura 13E Grão de pólen inviável	35
Figura 13F Grão de pólen inviável	35
Figura 14 Viabilidade dos grãos de pólen	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Características botânicas.....	12
2.2 Importância e utilização da mandioca.....	13
2.3 Melhoramento genético da mandioca.....	14
2.4 Citogenética como ferramenta no melhoramento.....	15
2.5 Viabilidade polínica.....	18
2.6 Citomixia.....	19
2.7 Caracterização morfológica.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Local e objeto de estudo	22
3.2 Estudo da meiose.....	22
3.3 Viabilidade polínica.....	23
3.4 Descritores morfológicos.....	23
3.5 Análise estatística.....	24
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	25
4.1 Comportamento meiótico.....	25
4.2 Viabilidade polínica.....	34
4.3 Características morfológicas.....	36
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

A mandioca é uma planta originária da América do Sul e teve um papel relevante para as populações nativas do Brasil e de outros países, como cultura de subsistência e também como produto de valor comercial. É uma cultura rústica, adaptada às condições marginais de clima e solo. Constitui uma das mais importantes fontes de carboidratos de milhões de pessoas em vários países tropicais. É considerada uma planta completa com suas raízes ricas em carboidratos, e folhas ricas em proteínas, vitaminas A e C, além de outros nutrientes (FUKUDA e outros, 2005). É usada em vários países como Brasil, África, Ásia e América Latina, entre outros. Por ser fonte de carboidrato, é usada na alimentação humana e animal para fins industriais. Apesar da disponibilidade de uma ampla diversidade genética em mandioca, poucas variedades apresentam uma combinação razoável de resistência a todos os estresses que afetam a cultura em um determinado ecossistema. Somente por meio da seleção adequada dos progenitores, seguida de recombinações, é possível obter ganhos genéticos significativos em termos de rendimento, qualidade e resistência a pragas e doenças (FUKUDA e outros, 1996a). O cultivo de mandioca é o principal meio de vida de muitas pessoas da Região Sudoeste da Bahia, sendo assim, é importante pesquisar esta planta, afim de apontar caminhos para resolver alguns problemas que a cultura apresenta. Portanto, o estudo citogenético apresenta-se como ferramenta importante de caracterização de material com potencial para ser utilizado em programas de melhoramento.

Nas análises citogenéticas da meiose, a mandioca demonstra ser uma espécie diplóide, possuindo $2n=36$ cromossomos, com meiose regular de 18 bivalentes, mas de origem alotetraploide segmental com um número básico de cromossomo $X = 9$ (SILVA e outros, 2008). O estudo cariotípico em células meióticas ou mitóticas possibilita a identificação dos polimorfismos

cromossômicos numéricos e/ou estruturais entre os cariótipos e a descrição da homologia cariotípica nas cultivares, fornecendo informações relevantes como alterações cromossômicas, taxa de fertilidade, problemas no reconhecimento dos homólogos, não disjunção cromossômica nas anáfases, geração de gametas aneuploides, percentual dos genomas parentais nos híbridos, etc. Estas informações, relacionadas à base genética de espécies aparentadas, são muito importantes para trabalhos envolvendo cruzamentos intra e interespecíficos com fins de melhoramento para uma determinada cultura. Esses dados podem ser associados às características agronômicas individuais em híbridos, possibilitando localizar variantes genotípicas e sua relação com produção, tolerância a fatores bióticos e abióticos etc. Dessa forma, a indicação de parentais favoráveis a hibridações pode ser auxiliada pelo uso de características citogenéticas. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização citogenética e morfológica de seis híbridos de mandioca, com vistas a obter informações sobre possíveis irregularidades cromossômicas e infertilidade que poderiam comprometer o uso destes em programas de melhoramento.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características Botânicas

A mandioca pertence à classe das Dicotiledôneas, à subclasse Archiclamydeae, à ordem Euphorbiales, à família Euphorbiaceae, à tribo Manihoteae, ao gênero *Manihot* e à espécie *Manihot esculenta* Crantz (FARIAS e outros 2006). No gênero *Manihot*, já foram identificadas cerca de 98 espécies. A *Manihot esculenta* Crantz é a única espécie deste gênero cultivada comercialmente para a produção de raízes comestíveis e apresenta as seguintes sinonímias: *M. utilissima*, *M. edulis* e *M. aipi*. É conhecida na América Latina como mandioca e yuca; no Continente Norte-Americano e países da Europa, como cassava, manioc, manioca e tapioca; e nos países da Ásia e da África, como suahili, mhogo e omowgo (FARIAS e outros 2006). A estrutura orgânica reprodutiva de *M. esculenta* é típica de espécies alógamas. Para fins de melhoramento genético, a taxa de cruzamento é facilmente manejável, permitindo desde 100% de autofecundação até 100% de cruzamentos (FARIAS e outros 2006). A mandioca é uma espécie monoica, com flores masculinas e femininas dispostas na mesma inflorescência. As flores masculinas são formadas na parte superior das inflorescências, em maior número, enquanto as flores femininas encontram-se na parte basal, em número inferior. Apresenta protoginia, ou seja, as flores femininas abrem uma semana antes das flores masculinas. Entretanto, durante as inflorescências da mesma planta podem ocorrer a abertura simultânea das flores masculinas e femininas. Dessa forma, tanto a autofecundação como a fecundação cruzada ocorre naturalmente. É considerada uma espécie preferencialmente alógama e altamente heterozigota, em função do caráter protogênico da antese floral, da ocorrência de macho-esterilidade e da forte depressão endogâmica ocasionada

pelas autofecundações, apesar de não existir barreira genética ou fisiológica que impeça a ocorrência de autofecundações.

2.2 Importância e utilização da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma espécie de grande importância econômica, embora seu consumo de certo modo concentre-se no Nordeste, Norte e no Centro Oeste do Brasil, mas, ela está presente em todo o território nacional. As espécies podem ser divididas em dois grupos: espécies mansas e bravas. Esse vegetal apresenta-se como uma ótima alternativa para alimentação animal, devido à sua disponibilidade justamente no período seco do ano, em que os pastos diminuem em quantidade e qualidade, de junho a outubro (NARDON, 2007). No Brasil, a raiz da mandioca é utilizada na preparação de farinhas, como a farinha de mandioca e tapioca, além de receitas típicas da Amazônia como o tacacá e o molho tucupí. Outro tipo de farinha feita com a mandioca é o polvilho, doce ou azedo, usado na preparação de diversas comidas típicas. Já as folhas da mandioca, para alimentação humana, são utilizadas apenas na Região Norte. A mandioca é pobre em proteínas, mas contém quantidades razoáveis de vitaminas do complexo B e sais minerais como cálcio, fósforo e ferro. Por ser um alimento energético, pode substituir outras massas. A utilização da mandioca é feita por meio das raízes, do caule (maniva) e folhas. As raízes produzem farinhas (para mesa, para indústria), beijos diversos, tapioca (mingau, cuscuz, bolinho de estudante), puba ou carimã (mingau, amido, álcool etílico); o caule é o principal órgão multiplicador da planta e presta-se também como forragem para animais. O componente mais importante da raiz da mandioca é a fécula (amido), cujo teor nas raízes frescas varia de 25 a 35%. Por meio de processos de fermentação e ação enzimática, além de outras reações químicas, as indústrias extraem da mandioca vários produtos químicos, dentre os quais, o principal é o álcool combustível (SALLA, 2008).

2.3 Melhoramento genético da mandioca

Apesar de adaptar-se a diferentes condições edafoclimáticas, a mandioca apresenta alta interação dos híbridos com o ambiente, indicando que um mesmo genótipo dificilmente comporta-se da mesma maneira em todas as regiões ecológicas (LEITÃO, 1970).

Nessa cultura, alguns fatores influenciam a escolha dos métodos de melhoramento, tais como as características genéticas e citogenéticas da espécie, o nível de endogamia, o hábito de florescimento e de polinização das plantas, a baixa taxa de produção de semente por polinização e o seu modo de propagação vegetativa. Acrescenta-se a isso, a macho-esterilidade, comum na espécie, e o seu alto grau de heterozigosidade (FARIAS e outros, 2006). A mandioca, por tratar-se de uma espécie alógama, altamente heterozigota, apresenta ampla segregação na primeira geração, após a hibridação. Uma vez identificado um híbrido superior, na primeira geração, o mesmo é fixado por meio da propagação vegetativa, o que constitui vantagem em trabalhos de melhoramento.

A hibridação intraespecífica, seguida de seleção, é o método mais comum utilizado em mandioca, quando se deseja criar variabilidade ou transferir características de interesse econômico. Os cruzamentos são realizados entre parentais da mesma espécie, portadores de características complementares, seguidos de seleção fenotípica dos clones, individualmente, baseada na sua performance, através de anos e em diferentes locais. O sucesso deste método depende, fundamentalmente, da escolha adequada dos parentais e da eficiência da seleção dos híbridos dentro das progênies, resultantes de cada cruzamento (FARIAS e outros, 2006).

O principal objetivo dos programas de melhoramento é desenvolver variedades superiores àquelas atualmente cultivadas, particularmente para

aqueles caracteres econômicos ou de importância biológica e que são aceitos pelos agricultores, processadores e consumidores. O sucesso do melhoramento genético da mandioca tem apresentado impactos econômicos significativos em áreas de maior produção, onde a adoção é mais rápida e existem demandas mais concretas por parte dos agricultores. Com a introdução de metodologias participativas no melhoramento da mandioca, o processo de adoção de variedades melhoradas tem-se ampliado no meio de pequenos agricultores, permitindo, assim, o estudo de impactos (FUKUDA, 1996b).

2.4 Citogenética como ferramenta no melhoramento

Sendo a citogenética o estudo da genética por meio da citologia, esta área da ciência engloba todo e qualquer estudo relacionado com o cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução. É uma das fontes geradoras de questionamentos que impulsionaram a genética molecular, a biotecnologia e a engenharia genética, permanecendo junto às mesmas, como um dos recursos de avaliação em várias pesquisas dessa natureza (SACCHET, 1999). A citogenética clássica desenvolveu-se, principalmente, a partir do início do século passado e seu crescente progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia. A análise cromossômica sempre foi um dos campos estimulantes da Citologia e da Genética, tendo relação entre estudos taxonômicos e evolutivos, bem como no melhoramento genético e na caracterização de germoplasma. Apesar da revolução provocada pela Genética Molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, fáceis de serem mensurados, diferenciados em subunidades e manipulados de diferentes formas, pois de nenhuma outra forma o material genético é tão claramente observado. A

obtenção de bons resultados depende do perfeito domínio de diferentes técnicas de coloração.

A utilização de corantes acidófilos na citogenética clássica possibilitou a visualização nítida dos cromossomos, revelando informações sobre diversos parâmetros citogenéticos. Nas últimas décadas, o uso de técnicas citogenéticas tem fornecido informações importantes por meio da localização física de certos marcadores nos cromossomos. A análise citogenética clássica, em geral, é realizada em cromossomos metafásicos mitóticos, corados com corante convencional como o Giemsa ou o Carmim Acético, por exemplo. Em uma análise de células mitóticas, aspectos como o número e comprimento dos cromossomos, razão entre braços cromossômicos, padrão de condensação e de coloração, além de características físicas adicionais, como presença e posição de constrição secundária, permitem a comparação de espécies e a identificação de variações cromossômicas inter e intra-específicas (GUERRA e outros, 2002). Em muitos casos, a simples determinação do número cromossômico fornece informações importantes para a compreensão da filogenia e evolução dos grupos, desde que associada a outras abordagens como morfologia e distribuição geográfica (STEBBINS, 1971).

O estudo citogenético em grupos vegetais de importância econômica pode proporcionar benefícios aplicáveis a curto, médio e longo prazo, solucionando questionamentos, tanto antes, quanto depois do melhoramento genético propriamente dito. A simples e direta análise cariotípica pode identificar alterações ou aberrações cromossômicas numéricas e/ou estruturais, além de possibilitar a descrição do comportamento meiótico, provendo informações, como taxa de fertilidade, problemas em relação ao pareamento ou reconhecimento dos cromossomos homólogos nos parentais e na progênie híbrida, além dos casos de não disjunção, ou seja, não segregação das cromátides nas anáfases, o que pode levar a formação de gametas aneuploides. Por outro lado, a caracterização citogenética detalhada, como o mapeamento

físico cromossômico, possibilita a descrição clara da homologia cariotípica de uma determinada cultivar ou variedade, permitindo a inclusão destes dados nos esquemas de cruzamentos e retrocruzamentos, contribuindo para minimizar possíveis erros de seleção de progênies ou ainda, determinando o percentual dos genomas parentais nos indivíduos híbridos. Dessa forma, a indicação de parentais favoráveis às hibridações pode ser facilitada por meio do uso de características citogenéticas (SINGH, 2002). Os estudos citogenéticos em espécies silvestres e cultivadas de *Solanum tuberosum* (batata) possibilitaram a observação de questões relevantes ao melhoramento genético desta cultura, como a produção de linhagens híbridas haploides, a manutenção do “status” haploide durante as gerações e a avaliação da instabilidade cromossômica, observada pela ocorrência de alterações estruturais (PELOQUIN e outros, 1991).

Carvalho e outros (2008), analisando os cromossomos metafásicos mitóticos, observaram uma diferença marcante no número e posição das regiões organizadoras dos nucléolos (RONs) entre *M. leptophylla* e *M. glaziovii*, sendo este considerado um bom marcador espécie-específico. Silva e outros (2008), estudando as variedades Pornunça e Manipeba, encontraram irregularidades meióticas e estas irregularidades levaram à esterilidade total dos grãos de pólen. Godoy (2005), estudando clones de *Manihot*, encontrou irregularidades na meiose, mas estas não comprometeram a viabilidade polínica que se apresentou acima de 90%. Para Sybenga (2006), a citogenética fornece informações indispensáveis para a manipulação plantas. Loguercio e Battistin (2004), estudando nove acessos de *Syzygium cumini* L., observaram que ambos os acessos possuem comportamento meiótico normal, com índice meiótico acima de 91%. As diferenças durante os eventos da meiose I, da meiose II, da formação de tétrades e da viabilidade do pólen refletem a ocorrência de variabilidade genética dentro da espécie. Por outro lado, Moraes (2007), analisando o comportamento meiótico no gênero *Hypericum* L., verificou

irregularidades meióticas, como formação de multivalentes, cromossomos não alinhados na placa equatorial durante a metáfase I e de retardatários na anáfase. As irregularidades cromossômicas refletem diretamente nos processos reprodutivos das espécies com a formação de grãos de pólen inviáveis (MARUTANI e outros, 1993; CORRÊA e outros, 2005).

2.5 Viabilidade polínica

Segundo Auler e outros (2006), a viabilidade microsporofítica e megasporofítica está diretamente ligada às taxas de produtividade de frutos em espécies sem fenômenos apomíticos frequentes, fornecendo um dado para seleção de plantas mais produtivas. A viabilidade do pólen é um parâmetro de grande importância no estudo de plantas, pois, além de evidenciar a potencialidade reprodutora masculina da espécie, contribui em estudos taxonômicos, ecológicos, palinológicos, fornecendo informações básicas para a aplicação prática na conservação genética, bem como na agricultura, para o planejamento de algum tipo de melhoramento ou cultivo (ALEXANDER, 1980; ARROYO, 1981; GUINET 1989)

O estudo da estabilidade meiótica, juntamente com a análise da viabilidade do grão de pólen, permite indicar o potencial para cruzamentos da planta, fornecendo subsídios para usos futuros em programas de seleção, cruzamento e produção de sementes viáveis (VARGAS e outros, 2004).

Para Peñaloza (1995), a determinação da viabilidade do pólen é fundamental na investigação das causas da infertilidade das plantas, assim como para o conhecimento do potencial de reprodução de uma população e dos problemas de fertilidade que possam ocorrer. Segundo Techio (2002), por meio de dados de viabilidade do pólen, é possível obter correlações com anormalidades meióticas, auxiliar na seleção de materiais genéticos e fazer inferências sobre os melhores cruzamentos, tornando-se uma ferramenta útil

na condução de experimentos nas áreas agrícola e biotecnológica. Carvalho e outros (1999) analisaram a viabilidade de pólen do triploide *Manihot esculenta* Crantz de ocorrência espontânea e verificaram grãos de pólen de vários tamanhos. Porém, a coloração dos grãos de pólen com carmim acético mostrou 100% dos grãos levemente corados, sugerindo esterilidade total.

2.6 Citomixia

A citomixia caracteriza-se pela migração de material genético, produtos gênicos e organelas entre meiócitos, por meio de conexões citoplasmáticas ou canais citomíticos (FALISTOCCO e outros, 1995). Esse fenômeno tem sido relatado por diversos autores para diferentes grupos de planta, é um evento observado, principalmente, entre células-mãe dos grãos de pólen (CMPs) de angiospermas, mas também encontrado em células meristemáticas, células integumentares e do ovário de diferentes espécies vegetais (GUZICKA e WOZNY, 2005).

Risso-Pascotto e outros (2008), estudando a microsporogênese de *Manihot esculenta* Crantz, relataram, pela primeira vez, fusão celular e citomixia da profase I à telófase II e em grãos de pólen de clones de *Manihot*, as irregularidades observadas nos clones não comprometeram a fertilidade do grão de pólen. Risso-Pascotto e outros (2009) observaram também citomixia em um acesso de *Brachiaria dura*, na qual duas células ou mais foram envolvidas na transferência de cromossomos. Para Singhal e Kumar (2008), o “papel da citomixia na evolução é contraditório, pois pode resultar em células hiperploide e hiporploide e comprometer a fertilidade, gerando gametas estéreis, quando é transferido parte do genoma”.

Segundo Pierre e Souza (2011), a citomixia pode ocasionar a formação de meiosporos vazios, aneuploides, não reduzidos ($2n$) ou poliploides, dependendo do número de meiócitos envolvidos e do tipo de

transferência de material genético.

São muitas as teorias sobre a origem da citomixia, Souza e Pagliarini (1997) sugeriram que a citomixia observada durante a microsporogênese de *Brassica napus* e *B. campestris* (Brassicaceae) foi devida a estresses ambientais causados por altas temperaturas e escassez de água. Bhat e outros (2006), analisando meioses durante a microsporogênese de plantas de *Vicia faba* (Fabaceae), tratadas com metil metano sulfonato, indicaram que o aumento da concentração desta substância exerceu um efeito positivo sobre o percentual de células citomíticas; isto sugere que a citomixia pode ser induzida por agentes físico-químicos. Nirmala e Kaul (1994) observaram em *Pisum sativum* (Fabaceae) a ocorrência regular da citomixia em anos consecutivos em diferentes indivíduos, sugerindo um controle genético, sendo a ocorrência de citomixia causada pela presença de um alelo mutante para macho-esterilidade, e a sua frequência influenciada por fatores ambientais. Bellucci e outros (2003) estudaram CMPs de cultivares citomíticas que produziam poucas sementes. As mesmas foram autofecundadas, cruzadas entre si e com cultivares não citomíticas em diferentes locais; as plantas resultantes revelaram a presença de citomixia e apresentaram baixa viabilidade polínica. Nos dois locais testados, a média de citomixia e da viabilidade do pólen foram iguais, indicando que essas são pouco influenciadas pelo ambiente. Os autores sugerem que este fenômeno natural está sob um controle genético.

Em *Citrus* (Rutaceae), Bosco e Mariani (2005) correlacionaram a redução na viabilidade de grãos de pólen de híbridos e tetraploides resultantes de hibridização somática interespecífica com a ocorrência de citomixia.

2.7 Caracterização morfológica

A diversidade morfológica constitui uma importante ferramenta para a identificação de acessos de mandioca, diferenciação daqueles com algumas características semelhantes e detecção de materiais duplicados em bancos de germoplasma, que eventualmente recebem diferentes nomenclaturas em locais distintos (CAMPOS e outros, 2010).

Boa parte desta diversidade é mantida em bancos de Germoplasma situados no Brasil e no exterior, com finalidade de reduzir a erosão genética, sendo utilizada diretamente como cultivares comerciais e para programas de melhoramento (GOMES e outros, 2007). Esta diversidade se expressa, entre outras maneiras, no grande número de variedades que as espécies cultivadas apresentam (MUHLEN, 1999). Entretanto, a manutenção da variabilidade genotípica seria pouco útil se os acessos que a compõem não fossem devidamente caracterizados e avaliados (FUKUDA e outros, 2005).

A caracterização e avaliação do germoplasma de mandioca são fundamentais para a sua utilização mais eficiente nos trabalhos de melhoramento. A caracterização morfológica dos acessos de mandioca visa basicamente a diferenciação fenotípica entre os acessos, contribuindo para reduzir-se as duplicações e selecionar aqueles que atendam as necessidades dos programas de melhoramento da cultura (ALMEIDA e outros, 1993; ARAUJO e outros, 2005).

O melhoramento vegetal é um trabalho contínuo que visa selecionar materiais produtivos, sadios e com boas características para o mercado. Existe uma interrelação da cultura com o ambiente de cultivo, necessitando-se verificar o comportamento adaptativo local de cada material promissor introduzido (SCHWENGBER e MESSIAS, 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local e objeto de estudo

As investigações foram conduzidas em área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), localizada no Campus de Vitória da Conquista - BA (14° 51' S e 40° 50' W, altitude média de 928 m) e no Laboratório de Citogenética. Foram estudados seis híbridos de mandioca originados por cruzamento natural na Coleção de Germoplasma de Trabalho da Mandioca – CGTM (Tabela 01) na UESB, Vitória da Conquista- BA.

Tabela 01. Híbridos de mandioca e seus parentais

Cruzamentos	Híbridos
CGTM 02 x CGTM 21	2009.02
CGTM 60 x CGTM 08	2009.25
CGTM 60 x CGTM 77	2009.30
CGTM 87 x CGTM 60	2009.48
CGTM 51 x CGTM 54	2009.57
CGTM 36 x CGTM 84.	2009.61

3.2 Estudo da Meiose

Os botões florais jovens foram coletados e colocados diretamente em fixador Carnoy (etanol-ácido acético 3:1) por 24 h e estocados a -20°C antes da preparação das lâminas. Eles foram lavados em água destilada, duas vezes por 5 minutos cada, em seguida, foram hidrolisados em HCl 1N, por 5-10 minutos à temperatura ambiente. Logo depois, as lâminas foram preparadas

de acordo com a metodologia de Guerra (1983) e coradas com Giemsa a 3%, montadas com Bálsamo do Canadá e analisadas sob microscopia óptica.

3.3 Viabilidade Polínica

Para análise de viabilidade, os grãos de pólen foram retirados de flores na antese, as lâminas foram preparadas conforme Guerra e Souza (1983), coradas com Carmim Acético a 2% e observadas ao microscópio ótico. Foram contados o número de grãos de pólen de tamanho grande ou médio, bem corados e com formato regular, considerados como viáveis, e os que não se enquadravam nesta classificação foram considerados inviáveis.

3.4 Descritores Morfológicos

A coleta de dados foi realizada no mês de junho de 2011. A caracterização morfológica dos híbridos foi realizada conforme descritores proposta por Fukuda e Guevara (1998). Foram avaliadas somente características da parte aérea, por meio de vinte e oito descritores morfológicos, sendo eles vinte e um de caracteres qualitativos: cor da folha apical, pubescência do broto apical, forma do lóbulo central, cor do pecíolo, cor do córtex do caule, cor externa do caule, comprimento da filotaxia, floração, cor da folha desenvolvida, número de lóbulos, cor da epiderme, hábito de crescimento do caule, cor dos ramos terminais nas plantas adultas, cor da nervura, posição do pecíolo, proeminência das cicatrizes, comprimento das estípulas, margem das estípulas, hábito de ramificação, sinuosidade do lóbulo foliar e tipo de planta de sete caracteres quantitativos: comprimento médio do pecíolo (cm), altura da planta (cm), altura da primeira ramificação (cm), comprimento médio do lóbulo foliar, distância

média de entrenós, largura média do lóbulo foliar e relação comprimento/largura do lóbulo foliar central.

3.5 Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e seis tratamentos. As características analisadas foram: formação de tétrades, díades e tríades, número de células em divisão meiótica, número de grãos de pólen viáveis e inviáveis e número de anormalidades. Na análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância e à comparação de média pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, por meio do Programa SAEG versão 9.1.

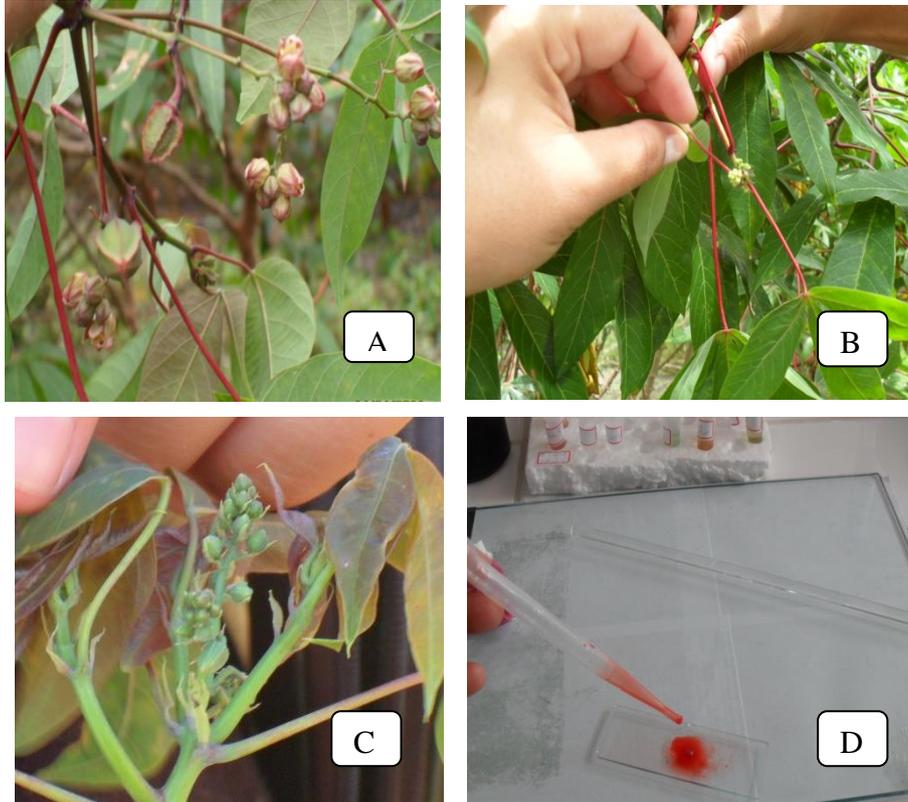


Figura 1. A- Inflorescência de *M. esculenta*, B e C - botões florais, D -coloração em grão de pólen.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comportamento Meiótico

O número de cromossomos observados na análise da metáfase I dos híbridos foi de 36 cromossomos, mostrando-se 18 bivalentes (Figura 3). Portanto, estes híbridos mostraram-se tetraploides $2n = 4x = 36$, já que o número básico de cromossomos para este gênero é de $x = 9$ (NASSAR e outros, 1995; NASSAR e outros, 2000). Os híbridos 2009.02, 2009.25,

2009.30, 2009.57 e 2009.61 tiveram um comportamento meiótico normal e segregação regular (Figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2E e 2F) e, conseqüentemente, com formação de grãos de pólen viáveis, sugerindo indivíduos férteis.

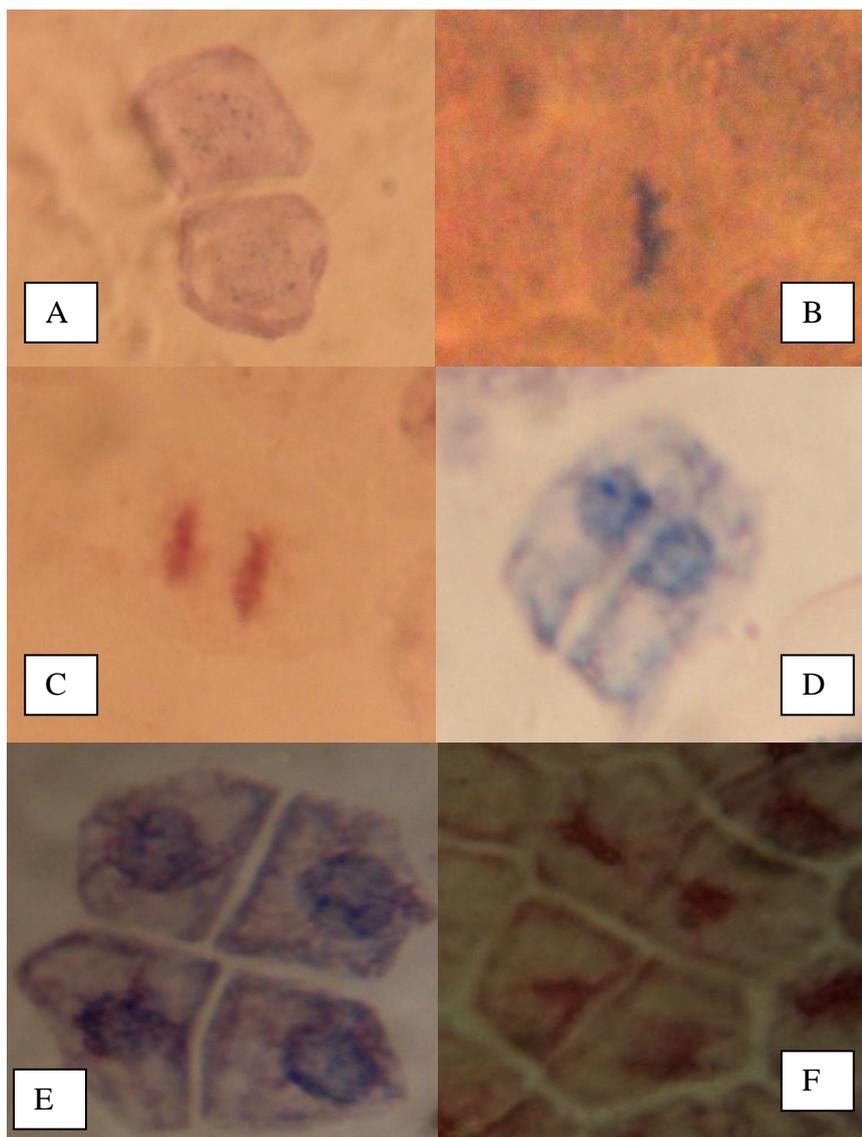


Figura 2. A - prófase I, B- metáfase, C- anáfase, D- telófase I, E- prófase II e F- tétrades normais.

Foram observadas algumas irregularidades meióticas (Fig. 4, 5, 6 e 7 A e B), mas estas não foram suficientes para comprometer a fertilidade. Os resultados da análise meiótica, por meio do teste de comparação de médias (Tabela 02), demonstram que houve diferença significativa entre os híbridos.

Tabela 02. Frequência de formação de Tríades e Tétrades nos híbridos de Mandioca em meiose II.

Híbridos	Tríades	Tétrades
1	18,0B	80,2A
2	14,6B	85,4A
3	17,6B	82,4A
6	14,8B	85,2A
5	19,2B	80,8A
4	46,2A	53,8B

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

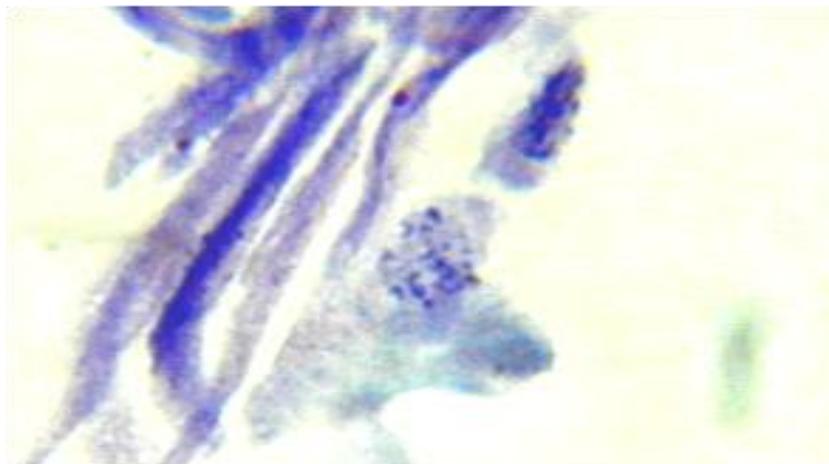


Figura 3. Configuração cromossômica revelando 36 cromossomos em associações de 18 bivalentes.

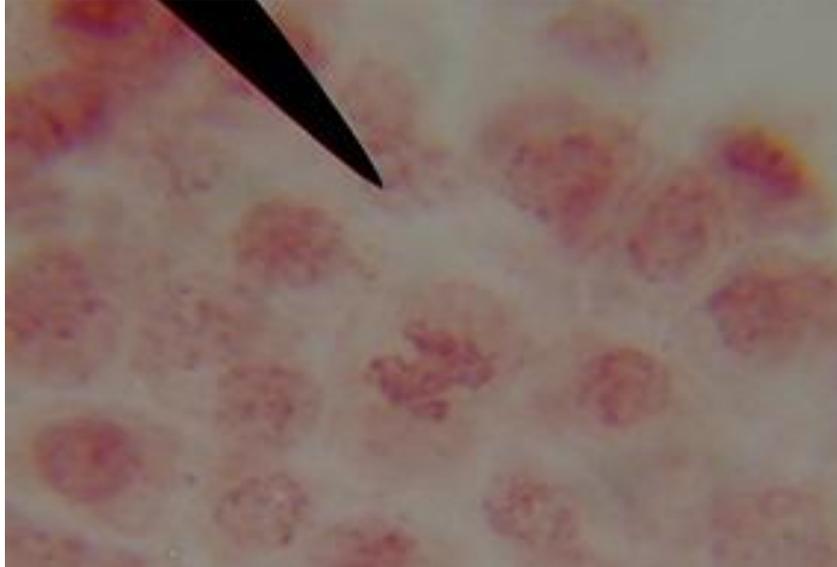


Figura 4. Não disjunção cromossômica na anáfase I do H2009.61

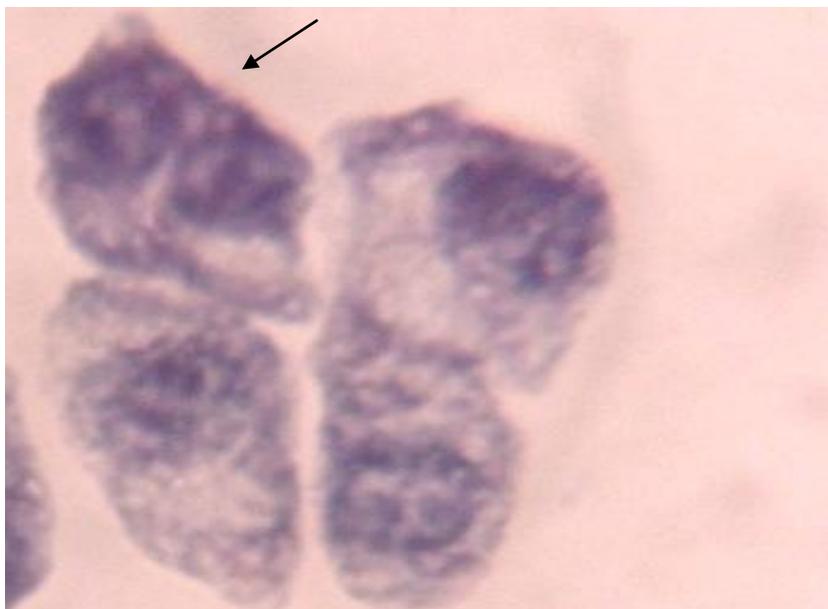


Figura 5. Tétrade anormal com célula binucleada na H2009.61.



Figura 6. Tétrade com célula trinucleada do H2009.61.

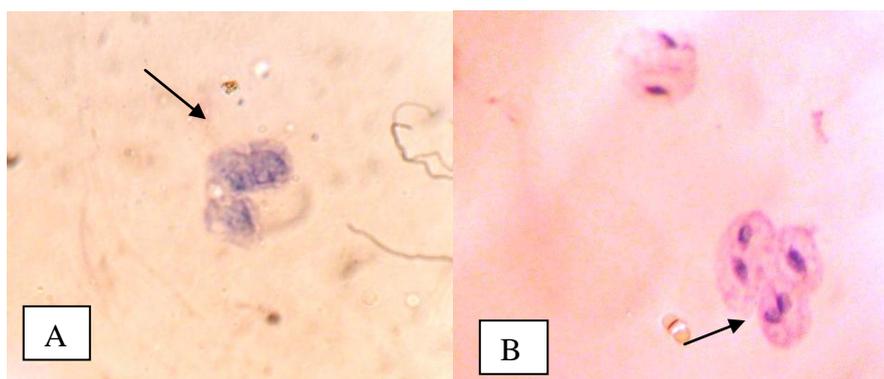


Figura 7. A - Tríade, B - tétrade com célula binucleada no H2009.30.

O genótipo 2009.48 mostrou uma meiose aparentemente regular, embora tenha ocorrido algumas irregularidades, como pontes anafásicas (Fig 8A), políade (Fig.8B), cromossomo solto (Fig.8C), tríades (Fig.8D), gametas não reduzidos (Fig.9) e citomixia (Fig.10), porém, a viabilidade polínica deste genótipo apresentou-se baixa, podendo ser decorrente das irregularidades meióticas. Este fenômeno também foi relatado em estudos

realizados por Nassar e outros (1995), analisando híbridos interespecíficos de mandioca tetraploide, nos quais observaram a presença de díades e tríades, formando gametas $2n$. Para Ramsey e Schemsk (1998), a formação de gametas $2n$ está sob controle genético, mas fatores ambientais, tais como temperatura, estresse hídrico e nutricional, podem afetar a produção de gametas masculinos não reduzidos. Para o melhoramento, este fenômeno de não redução de gametas favorece a poliploidização sexual, seja pela união de um gameta normal e outro não reduzido ou pela união de dois gametas não reduzidos, mantendo, assim, a heterozigose, permitindo a introgressão de genes desejáveis (SCHIFINO e WITTMANNE DALL'AGNOL, 2001).

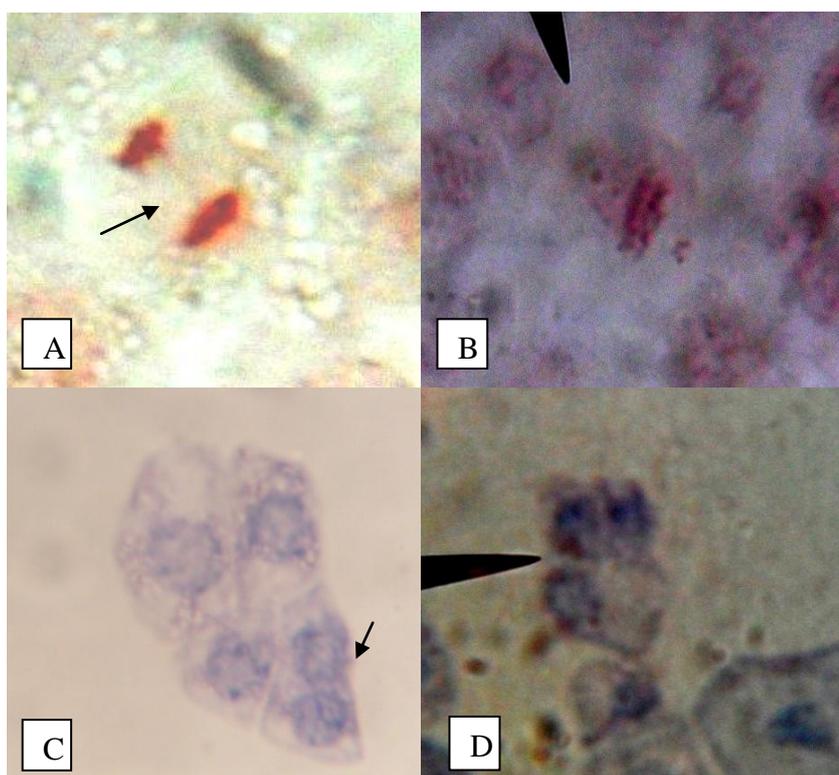


Figura 8. A -Ponte anafásica, B - políade, C - cromossomo solto e D – tríade do H2009.48

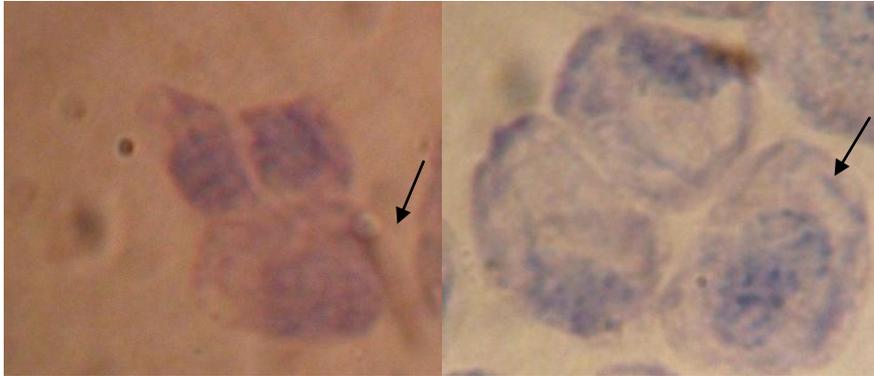


Figura 9. Tríades com gameta não reduzido no H2009.48.

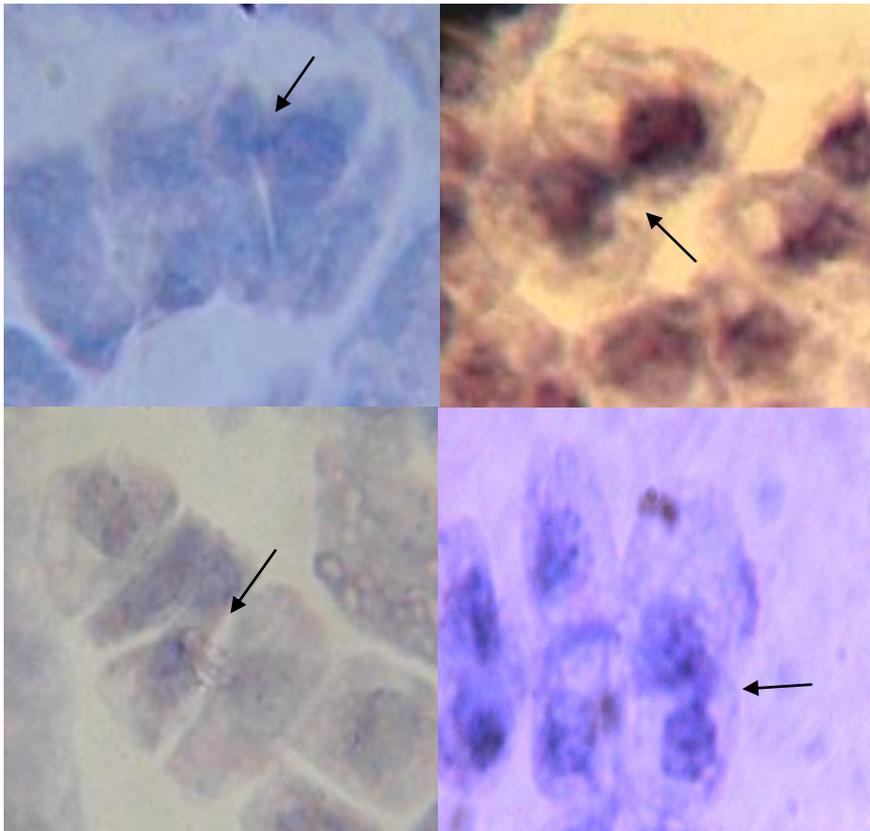


Figura 10. Citomixia no H2009.48

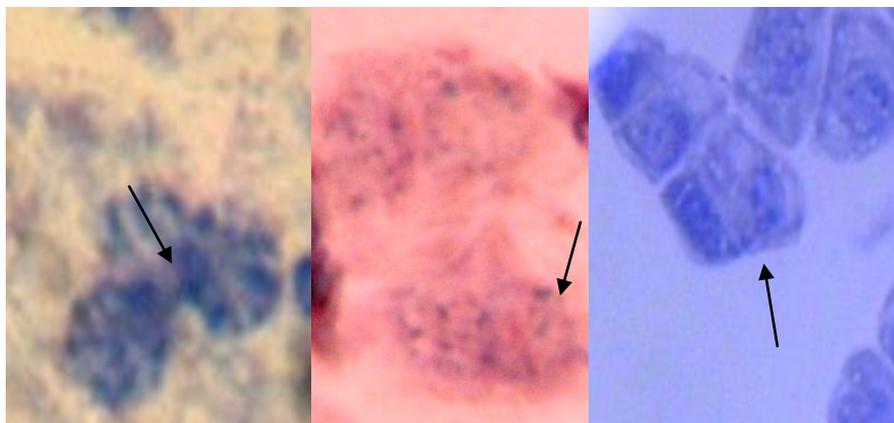
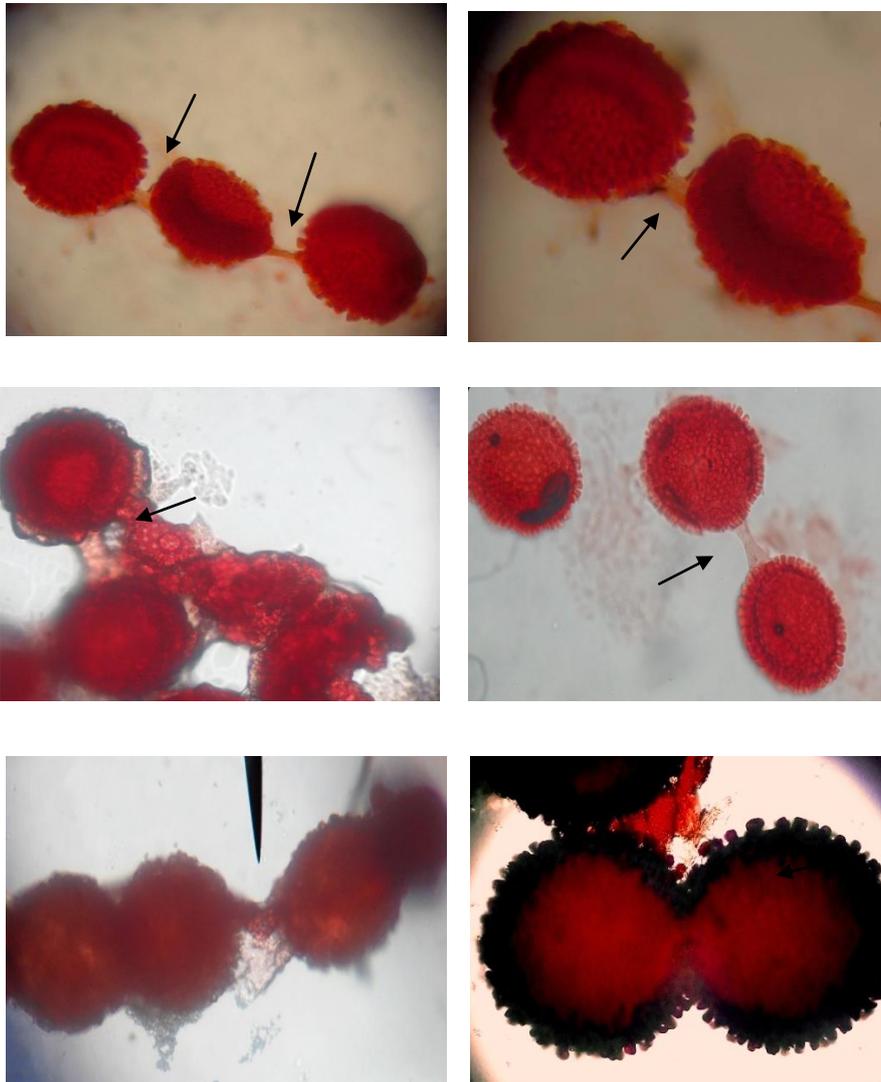


Figura 11. Citomixia no H2009.61

A fusão celular e citomixia ocorreram nos híbridos 2009.61 (Figura 11) e 2009.48, sendo que neste último, entre 500 células observadas, 20,4% apresentaram o fenômeno e no genótipo 2009.61 foi observado a ocorrência de 6,4% do fenômeno.

Assim como em vários estudos (PAGLIARINI, 2000, SAGOO e outros, 2010, POZZOBON e outros, 2011), as irregularidades meióticas associados com a citomixia provocaram a baixa viabilidade polínica do genótipo 2009.48. O comportamento meiótico dos seis híbridos está resumido na Tabela 2. Entretanto, no genótipo 2009.61, apesar de ter sido registrado citomixia, esta não afetou a viabilidade do grão de pólen; resultado semelhante foi também observado por Riso-Pascotto (2008) em clones de *Manihot* e Pozzobon e outros (2011) em linhagens avançadas de pimenta. Neste trabalho, foi observado citomixia em grão de pólen (Figura 12) e fusão celular, estes fenômenos estão sendo descritos pela primeira vez em híbridos de mandioca.



12. Citomixia em grãos de pólen dos híbridos 2009.02, 2009.25 e 2009.57.

A citomixia em grão de pólen envolveu dois e três grãos (Figura 12). Fenômeno semelhante foi observado por Risso-Pascotto e outros (2008). Segundo Sarvella (1958), a citomixia pode ter consequências genéticas por causar desvios no número de cromossomos e pode representar um mecanismo adicional para origem de aneuploidia e poliploidia. O significado

deste evento ainda não está totalmente compreendido, necessitando estudos mais aprofundados.

4.2 Viabilidade Polínica

A viabilidade dos grãos de pólen dos híbridos estudados pelo método de coloração por Carmim Acético apresentou-se alta nos híbridos 2009.02 e 2009.61, média nos híbridos 2009.25, 2009.30 e 2009.57, e baixa no genótipo 2009.48. Foram considerados viáveis os grãos que se apresentaram de tamanho e forma regular e corado (Figura 13A), e inviáveis os grãos pequenos e não corados (Figuras 13B, C D, E e F). Os resultados da análise de variância da viabilidade dos grãos de pólen, expressos em porcentagem, estão na Figura 14. De acordo com Souza (2002), valores acima de 70% são considerados como de alta viabilidade do pólen, de 31 a 69% como média e até 30%, baixa. A regularidade meiótica e, conseqüentemente, viabilidade polínica dependem, principalmente, da homologia cromossômica entre as variedades envolvidas no cruzamento (SOUZA E OUTROS, 2002). Em revisão sobre o assunto, Corrêa e outros (2005) relataram que uma elevada porcentagem de grãos de pólen viáveis é esperada como resultado de um alto percentual de tétrades normais em diversas espécies. A perda da viabilidade do pólen em diferentes espécies tem sido correlacionada também com a perda de água, tanto em condições naturais como de laboratório (TECCHIO, 2006). Assim, neste trabalho, foi possível correlacionar irregularidades meióticas com baixa frequência de grãos de pólen viáveis, pois o genótipo que apresentou maior quantidade de irregularidades na meiose, também apresentou a menor taxa de viabilidade polínica. Bione e outros (2000), estudando o comportamento meiótico de variedades de soja, constataram a estreita relação entre anormalidades meióticas e a infertilidade do grão de pólen.

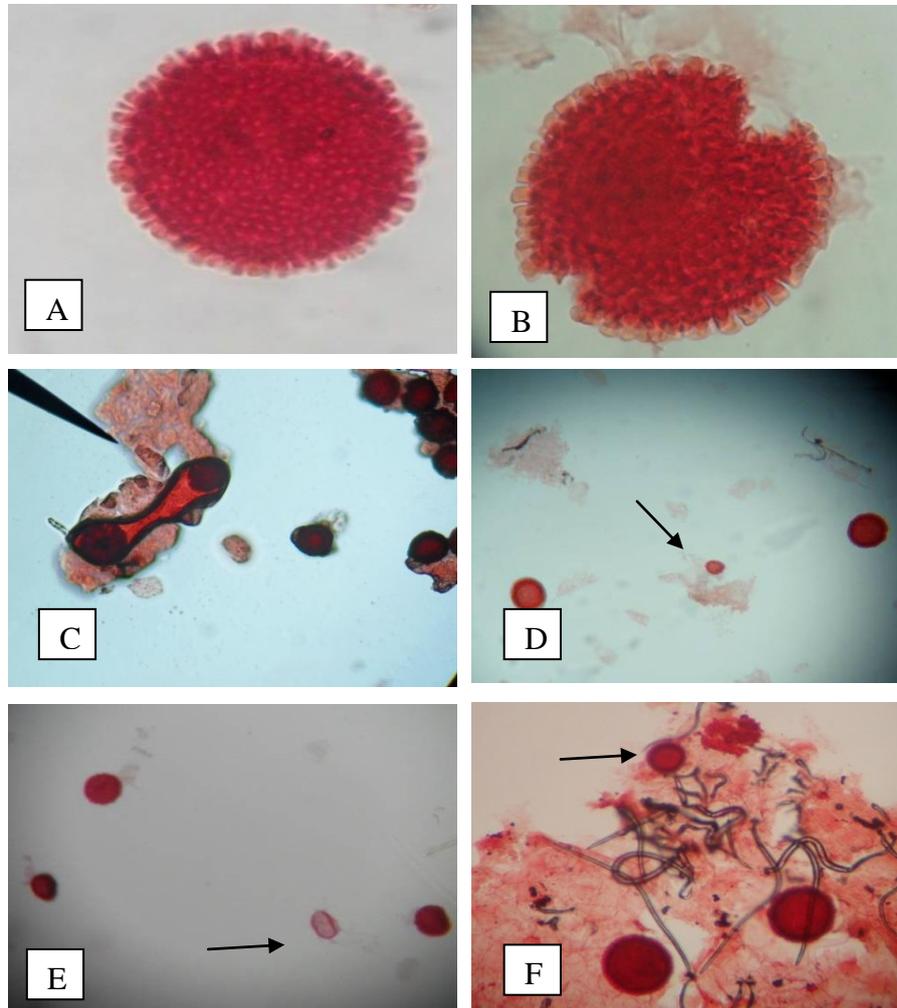
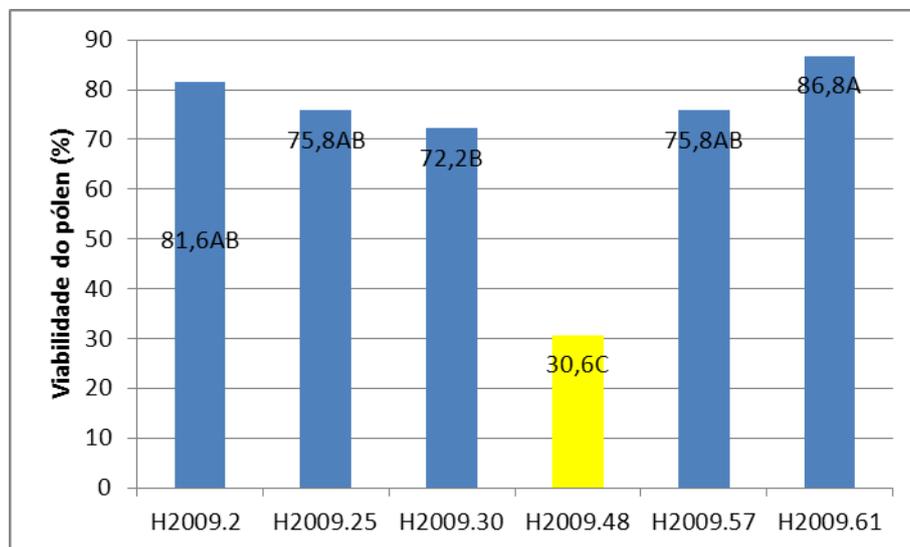


Figura 13. A - grão de pólen viável, B - grão de pólen aberto, C, D, E e F- grãos de polens inviáveis (seta).

Figura 14. Viabilidade dos grãos de pólen dos híbridos de mandioca.



Médias seguidas com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

4.3 Características morfológicas

Os resultados permitem inferir que, para as condições agroecológicas de Vitória da Conquista-BA, os híbridos diferem morfológicamente em alguns caracteres avaliados na parte aérea, conforme descrito na Tabela 03. Observou-se que os materiais avaliados diferem na maioria dos caracteres abordados, exceto a pubescência da folha apical, cor da epiderme, cor da nervura e proeminência de cicatrizes foliares que se apresentaram iguais em todos os híbridos de mandioca. Nesse sentido, a diversidade fenotípica manifestada permite inferir que os materiais descritos apresentam divergência genética para vários caracteres, constituindo, portanto, híbridos distintos. Isso é reforçado pelo fato de que todas as plantas foram cultivadas num mesmo local e período, estando, deste modo, sujeitas às condições ambientais similares que, eventualmente, podem induzir as alterações morfológicas em plantas de um mesmo genótipo. Os caracteres

quantitativos, apesar de, aparentemente, diferirem, não se pode fazer inferências, pela impossibilidade de realizar análises estatísticas com os dados por falta de repetição das plantas.

Tabela 03 - Caracterização morfológica da parte aérea de híbridos de mandioca.

Descritores	G2009.02	H2009.25	H2009.30	H2009.48	H2009.57	H2009.61
Cor da folha apical	verde - claro	verde - escuro	verde - escuro	verde - escuro	verde - claro	verde - claro
Pubescência do broto apical	Presente	presente	presente	presente	presente	Presente
Forma do lóbulo central	elíptica-lanceolada	obovada-lanceolada	lanceolada	ovóide	lanceolada	Lanceolada
Cor do pecíolo	Vermelho	verde-avermelhado	vermelho	vermelho-esverdeado	verde-avermelhado	verde-amarelado
Cor do córtex do caule	Amarelo	verde-claro	verde-claro	verde-claro	verde-claro	verde-claro
Cor externa do caule	marrom claro	dourado	dourado	marrom claro	marrom claro	marrom - claro
Comprimento da filotaxia	longo >15 cm	longo >15 cm	longo >15 cm	longo >15 cm	longo >15 cm	longo >15 cm
floração	Ausente	presente	ausente	presente	ausente	Ausente
Cor da folha desenvolvida	verde-claro	verde-escura	verde-escura	verde-escura	verde-claro	verde-escura
Nº de lóbulos	Cinco	cinco	sete	cinco	sete	Sete
Comprimento médio do pecíolo	9,2 cm	9,2 cm	12,8 cm	14,1 cm	9,2 cm	9,2 cm
Cor da epiderme	marrom claro	marrom claro	marrom claro	marrom claro	marrom claro	marrom claro
Hábito de crescimento do caule	zig-zag	zig-zag	reto	zig-zag	reto	Reto
Sinuosidade do lóbulo foliar	Sinuoso	liso	liso	liso	liso	Sinuoso
Cor dos ramos terminais nas plantas adultas	verde - arroxeadado	verde	verde- arroxeadado	verde	verde- arroxeadado	Roxo
Altura da planta	290 cm	360 cm	394 cm	394 cm	264 cm	380 cm
Altura da primeira ramificação	110 cm	220 cm	230 cm	230 cm	180 cm	180 cm
Cor da nervura	verde-vermelho em menos da me. do lóbulo	verde-vermelho em menos da metade do lóbulo				
Descritores	H2009.02	H2009.25	H2009.30	H2009.48	H2009.57	H2009.61
Posição do	horizontal	horizontal	horizontal	inclinado	inclinado	Horizontal

pecíolo				para baixo	para cima	
Proeminência das cicatrizes	proeminente	proeminente	proeminente	proeminente	proeminente	Proeminente
Comprimento das estípulas	Curtas	curtas	longa	curtas	curtas	Curtas
Margem das estípulas	Inteira	lanciniada	inteira	lanciniada	lanciniada	Lanciniada
Hábito de ramificação	dicotômico	dicotômico	dicotômico	dicotômico	tricotômico	Dicotômico
Tipo de planta	Aberta	aberta	cilíndrica	aberta	clíndrica	Cilíndrica
Comprimento médio do lóbulo foliar	12,2 cm	11 cm	9,2 cm	11,4 cm	7,2 cm	9,6 cm
Distância média de entrenós	3 cm	3,5 cm	3 cm	3,5 cm	4 cm	5 cm
Largura média do lóbulo foliar	3 cm	3,6 cm	2,4 cm	3,6 cm	2,2cm	3,6 cm
Relação comprimento/largura do lóbulo foliar central	3,7 cm	2,6 cm	3,6 cm	3,2 cm	3,1 cm	3,3 cm

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo meiótico de seis híbridos de mandioca revelou que os híbridos 2009.02, 2009.25, 2009.30, 2009.57 e 2009.61 apresentaram comportamento meiótico com poucas irregularidades, ou seja, no final da microsporogênese, formaram-se quatro microporos (tétrades), revelando uma meiose completamente normal em termos de divisão celular e, conseqüentemente, com formação de grãos de pólen viáveis. O genótipo 2009.48 apresentou a maior frequência de irregularidades, principalmente, a citomixia, descrita pela primeira em híbridos de mandioca, que comprometeram a viabilidade dos grãos de pólen, ou seja, ao final da microsporogênese, formaram-se muitas tríades. Com base nos descritores morfológicos, conclui-se que há divergência genética entre os híbridos. Embora preliminares, os resultados obtidos refletem claramente a possibilidade de uso de características citogenéticas e a importância desta avaliação prévia em híbridos de mandioca. A utilização do genótipo 2009.48, por exemplo, em programas de melhoramento, deve ser criteriosamente avaliada, devida à baixa fertilidade apresentada neste estudo.

Ao final deste estudo, constata-se que se faz necessário, também, um estudo da produtividade destes híbridos, para melhor avaliar a utilização destes em programa de melhoramento.

6 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M.P. A. **Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium.** Stain Technology, v.1, n.5, p.13-8, 1980.

ALMEIDA, F.C.G; ALMEIDA, F.A.G; CARVALHO, P.R. **Descritores práticos para a caracterização botânica de algumas cultivares de mandioca no estado do Ceara.** Ciências Agrônomicas, 24: 18-21. 1993.

AULER, N.M.F.; BATTISTIN, A.; REIS, M.S. **Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [Baccharis trimera (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.2, p.55-63, 2006.

ARAÚJO, F.S.; OLIVEIRA JUNIOR, J.O.L.; GOMES, R.L.F; MORAES, J.C.B; SAGRILO; ARAÚJO, A.R. **Caracterização morfo-agronômica de acessos de mandioca nas condições edafoclimáticas de Teresina,** In: Resumos... XI Congresso brasileiro de mandioca, Campo Grande, 2005.

ARROYO, M.T.K. **Breeding systems and pollination biology in leguminosae.** In: POLHILL, M.; RAVEN, P.H.(Eds). Advances in legumes systematics, Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p.723-69.

BELLUCCI, M.; ROSCINI, C; MARIANI, A. **Cytomixis in pollen mother cells of *Medicago sativa* L.** Journal of Heredity, 94(6): 512-516, 2003.

BHAT, T.A; PARVEEN, S.; KHAN A.H. **MMS-induced cytomixis in pollen mother cells of broad bean (*Vicia faba* L.).** Turkish Journal of Botany, 30: 273-279, 2006.

BIONE, N. C. P; PAGLIARINI M. S; TOLEDO, J. F. F. **Meiotic behavior of several Brazilian soybean varieties.** Genetics and Molecular Biology, 23, 3, 623-631, 2000.

BOSCO, S.F.D & MARIANI, A. **Meiotic abnormalities in PMCs of different *Citrus* populations.** Proceedings of the XLIX Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, 50, 2005.

CAMPOS A. L., ZACARIAS, A. J; COSTA, D. L; NEVES, L.G; BARELLI, M. A. A. SOBRINHO, S.P; LUZ, P.B. **Avaliação de acessos de mandioca**

do banco de germoplasma da UNEMAT Cáceres – Mato Grosso. Revista Tropicana – Ciências Agrárias e Biológicas v. 4, n. 2, p. 45, 2010.

CARVALHO, R.; GUERRA, M.; CARVALHO, P. C. L. **Occurrence of Spontaneous Triploidy in *Manihot esculenta* Crantz.** Cytologia, The Japan Mendel Society, v. 64, p.137-140, 1999.

CARVALHO, Reginaldo; SILVA, Kaliny V. P.; OLIVEIRA, Lêda F.; ALVES, Alfredo Augusto Cunha. **Citogenética como ferramenta para o melhoramento genético vegetal: análise mitótica e meiótica em espécies de *Manihot*.** XIII Congresso Brasileiro de Mandioca, 2008.

CORRÊA, M.G.S.; VIÉGAS, J.; SILVA, J.B.; ÁVILA, P.F.V.; BUSATO, G.R.; LEMES, J.S. **Meiose e viabilidade polínica na família *Araceae*.** Acta Botânica Brasilica, São Paulo, v.19, n.2, p.295-303, 2005.

FALISTOCCO, E; TOSTI, N; FALCINELLI, M. **Cytomixis in pollen mother cells of diploid *Dactylis*, one of origins of 2n gametes.** *Journal of Heredity*, 86: 448-453, 1995.

FARIAS, A.R.N; SOUZA, L.S.; MATTOS, P. L. P.; FUKUDA, W. M. G. **Aspectos Socioeconômicos e Agronômicos da Mandioca.** 1ª ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, p.112.

FUKUDA, W.M.G.; SILVA, S. O. MENDES, R. A. **Caracterização morfológica e agronômica do banco ativo de germoplasma de mandioca do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical.** In: Congresso Latino Americano de Raízes Tropicais, São Paulo, 1996a.

FUKUDA, W.M.G. **Mandioca: estratégia para um programa de melhoramento genético.** Cruz das Almas: EMBRAPA- CNPMF, 1996b. 35p.

FUKUDA, W.M.G.; GUEVARA, C.L. **Descritores Morfológicos e Agronômicos para a Caracterização de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).** Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1998, 38p.

FUKUDA, W.M.G.; COSTA, I.R.S.; SILVA, A.S. **Manejo e Conservação de Recursos Genéticos de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.** Cruz das Almas, Bahia EMBRAPA. 2005.

GODOY, S. M.; PEREIRA, A. R. A.; RISSO-PASCOTTO, C.; TAKAHASHI, M. **Análise do comportamento meiótico de clones de *Manihot esculenta* crantz de interesse econômico para a região Noroeste do Paraná.** IAPAR, 2005.

GOMES, C.N.; ASSIS, H.B.; CARVALHO, M.; CARVALHO, S.P. **Divergência genética entre clones de mandioca estimada por meio de caracteres agrônômicos.** In: Resumos. XII CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 2007, Paranavaí - PR. Revista Raizes e Amidos Tropicais (CERAT - UNESP), 2007.

GUERRA, M. **O uso do corante Giemsa na citologia vegetal.** Comparação entre a coloração simples e o bandeamento. Cienc. Cultura. 1983, 19-193p.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como Observar Cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana.** São Paulo, Funpec, 2002, 131p.

GUINET, P.H. **Advances in legume biology: structure evolution, and biology of pollen in Leguminosae.** St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1989. 842p.

GUZICKA, M. & WOZNY, A. **Cytomixis in shoot apex of Norway spruce (*Picea abies*) L.** Karst. *Trees*, 18: 722-724, 2005.

LEITÃO FILHO, H.F. **Caracterização Botânica de Cultivares de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).** Anais do I Encontro de Pesquisadores de Mandioca dos Países Andinos e do Estado de São Paulo. São Paulo, 1970, p 13-29.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A. **Microsporogênese de nove acessos de *Syzygiumcumini* L. Myrtaceae oriundos do Rio Grande do Sul – Brasil.** Revista da FZVA, Uruguaiana, v.11, n.1, p.95-106, 2004.

MORAES, I. C. R. de. **Caracterização citogenética e da biologia reprodutiva de três espécies do gênero *Hypericum* L. (Clusiaceae).** 2007. 64 p. Tese (Doutorado)-Instituto Agrônomo, Campinas-SP, 2007.

MUHLEN, G.S. **Avaliação da diversidade genética de etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com marcadores de D_A: RAPD, AFLP e Microssatélites.** Tese Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba. 176 p. 1999.

MARUTANI, N.; SHEFFER, R.O.; KAMEMOTO, H. **Cytological analysis of *Anthurium andraeanum* (Araceae) its related taxa and their hybrids.** American Journal of Botany, Columbus, v.80, n.2, p.93-103, 1993.

NASSAR, N.M.A, NASSAR H.N.M, VIEIRA, C e SARAIVA, S.L. **Cytogenetic behaviour of the interspecific hybrid of *Manihot neusana* Nassar and cassava, *Manihot esculenta* Crantz, and its backcross progeny.** Can. J. Plant Sci. 75: 675–678, 1995.

NASSAR, N.M.A. **Wild cassava spp.: biology and potentialities for genetic improvement.** Genet. Mol. Biol. 23: 201-212, 2000.

NARDON, R. F. **Pesquisa avalia feno da rama de mandioca na alimentação de ovinos e obtém ótima engorda.** AgroAgenda revista eletrônica, Santa Catarina, p.1-3 Julho de 2007.

NIRMALA, C. & KAUL, M.L.H.. **Male sterility in pea VI: Gene action duplicity.** Cytologia, 59: 195-201, 1994

PAGLIARINI, M. S. **Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility.** Genet. Mol. Biol. [online]. 2000, vol.23, n.4.

PELOQUIN, S.J.; WERNER, E.J.; YERK, G.L. In: T. Tsuchiya and P.K. Gupta (eds), **Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution**, Part B, p. 79. Elsevier, Amsterdam. 1991.

PEÑALOZA, A. P. S. **Caracterização de componentes biológicos da produção de sementes de *Arachis pintoi* (Leguminosae).** 1995. 82 f. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 1995.

PIERRE, P. M. O; SOUZA, S. M. **Citomixia em plantas: causas, mecanismos e consequências.** Revista Brasileira de Biociências, v.9, n.2, p.231-240, Porto Alegre, 2011.

POZZOBON, M. T.; SOUZA K. R.; CARVALHO, S. I.C; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta.** Horticultura Bras. vol.29, nº.2, pag. 212-216, Brasília Apr./June, 2011.

RAMSEY, J., SCHEMSKE, D.W. **Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants.** Annual Review of Ecology and Systematics, v.29, p.467-501, 1998.

RISSO-PASCOTTO, C; ALONSO-PEREIRA, A.R; GODOY, S.M; PERIN, L.R; SILVA, L.A; TAKAHASHI, M.**Fusão celular e citomixia durante a microsporogênese em *Manihot esculenta* Crantz.** 54º Congresso Brasileiro de Genética, Salvador,2008.

RISSO-PASCOTTO, C; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. **Chromosome number and microsporogenesis of two accessions of *Brachiaria dura* Stapf (Poaceae).** Biota Neotrop., vol. 9, no. 2, p.257-261, 2009.

SACCHET, A. M. O. F. **Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas.** Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999. p. 99-104.

SAGOO, M.I.M; GILL, A; WALIA,S. **Cytomixis in the microsporogenesis in populations of *Croton bonpladianum* of north India.** Cytologia, Vol.76, nº 1, p.67-72, 2010.

SALLA, D.A. **Análise energética de sistemas de produção de etanol a partir da mandioca, da cana-de-açúcar e do milho.** Faculdade de Ciências Agronômicas/ UNESP, Botucatu-SP, 185 p (tese de doutorado), 2008.

SARVELLA, P. **Cytomixis and the loss of chromosomes in meiotic and somatic cells of *Gossypium*.** *Cytologia* 23: 14-24, 1958.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T e DALL'AGNOL, M. **Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas.** Ciência Rural, Santa Maria, v.31, n.1, p.169-175, 2001.

SCHWENGBER, D.R.; MESSIAS, O.I. **Caracterização de variedades de mandioca da coleção de trabalho da Embrapa Roraima.** Embrapa. Revistarar, v.3, UNESP, 2007.

SILVA, K. V. P.; ALVES, A. A. C.; BENKO-ISEPPON, A.M.; CARVALHO, Reginaldo. **Estudo do comportamento meiótico em acessos do gênero *manihot***. XIII Congresso Brasileiro de Mandioca, 2008.

SILVA, M. L.; SILVA, K. V.; CARVALHO, R. **Análise meiótica e viabilidade do grão de pólen em *Manihot dichotoma* Ule, uma espécie selvagem de mandioca**. XII Congresso Brasileiro de Mandioca, 2008.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. CRC Press, Boca Raton, USA, 391p, 1993.

SINGHAL, V.K, KUMAR, P. **Impacto of cytomixis on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of Himalayan poppy (*Meconopsis aculeate* Royle)**. Journal Bioscience, vol. 33, nº3, pp. 371-380, India, 2008.

SOUZA, A.M; PAGLIARINI, M.S. **Cytomixis in *Brassica napus* var. *oleifera* and *Brassica campestris* var. *oleifera* (Brassicaceae)**. Cytologia, 1997.

SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. **Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa degener*)**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras. v. 26, n.6, p.1209 - 1217, 2002.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plant**. Edward Arnold, London, p.216, 1971.

SYBENGA, J. **Forty years of cytogenetics in plant**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.2, p.55-63, 2006.

TECHIO, V. H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum spp.*** 2002. 104 f. Tese (Doutorado)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

VARGAS, S. M. et al. **Caracterização meiótica de *C. argentea***. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50. Florianópolis. Anais. Florianópolis: Costão do Santinho Resort, 2004

