

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**VARIABILIDADE GENÉTICA DA PROGÊNIE DE UMA POPULAÇÃO
POLIEMBRIÔNICA DE *HANDROANTHUS OCHRACEUS* (BIGNONIACEAE)**

RODRIGO BORGES FERREIRA

Orientadora: Profa. Dra. Diana Salles Sampaio

Co-orientadora: Ma. Rafaela Cabral Marinho

Uberlândia - MG

Junho-2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**VARIABILIDADE GENÉTICA DA PROGÊNIE DE UMA POPULAÇÃO
POLIEMBRIÔNICA DE *HANDROANTHUS OCHRACEUS* (BIGNONIACEAE)**

RODRIGO BORGES FERREIRA

Orientadora: Profa. Dra. Diana Salles Sampaio

Co-orientadora: Ma. Rafaela Cabral Marinho

Monografia apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG

Junho-2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Ernestino e Maria de Fátima, pelos incentivos ao estudo, por todo apoio que me fez chegar até aqui e pelo amor incondicional, em especial minha mãe que despertou em mim a paixão pela Botânica.

Ao meu namorado Gustavo por todo incentivo e apoio.

À minha orientadora Diana primeiramente por acreditar no meu potencial e me ajudar a crescer dentro da área acadêmica, sendo a chave que abriu as portas para um novo caminho repleto de possibilidade. Pelo suporte teórico, pelas idéias e por montar todo esboço do projeto. Pela paciência, dedicação e profissionalismo e por me orientar nesta caminhada.

À minha co-orientadora Rafaela pela paciência, imensa dedicação, assertividade, pelos ensinamentos. Por demonstrar preocupação. Sem ela este trabalho jamais poderia ser realizado, foi meu maior suporte. Sou muito grato.

Ao Prof. Dr. Paulo Eugênio A. M. Oliveira por ter contribuído com a ideia inicial do projeto, cedido espaço para o trabalho no Laboratório de Morfologia Vegetal Microscopia e Imagem (LAMOVI 22C) e por ter viabilizado financeiramente o projeto.

Às minhas amigas Eduardo Vitorino e Keyme, que me forneceram suporte técnico. Natália pela companhia no laboratório durante as férias, Rodrigo e Sheyla pelos cafés.

Ao Eduardo Vitorino e à minha orientadora Diana pela coleta do material Botânico.

Ao Lázaro pelas conversas sobre vegetais e pelo apoio no transplante das plântulas.

Pelo CNPQ e PROPP-UFU que possibilitaram e fomentaram a bolsa de Iniciação Científica, indispensável para a realização deste.

RESUMO

De acordo com dados histológicos a poliembriõnia em *Handroanthus ochraceus* é um indicativo de apomixia esporofítica, na qual embriões sexuais parecem coexistir com adventícios na mesma semente. Entretanto, um estudo de populações apomíticas utilizando marcadores moleculares ISSR não verificou a presença de clones, mas uma elevada variabilidade genética. O objetivo do presente trabalho foi verificar se progênies de uma população poliembriônica de *H. ochraceus* apresentam plântulas clonais e/ou sexuadas, a fim de corroborar a existência de apomixia esporofítica e compreender o não aparecimento de clones no trabalho anterior com marcadores ISSR. Foram analisadas cinco plantas mãe e suas progênies através de 11 *primers* ISSR, totalizando 33 amostras. Foram obtidas 64 bandas apresentando $P = 29,06\%$, $I = 0,155$, $H_e = 0,104$, sendo a maior diversidade genética encontrada dentro dos conjuntos de planta mãe e suas progênies (AMOVA –87% dentro x 13% entre). Os pares de indivíduos tiveram todos os loci iguais ou diferiram de um a 27 loci. Pares de indivíduos que diferiam em um e três loci foram considerados possíveis clones dada a possibilidade de mutações somáticas. Foi encontrado um indivíduo com todos os loci idênticos aos da planta mãe. Duas sementes poliembriônicas tiveram seus pares de plântulas diferindo de nenhum a três loci entre si e em relação à mãe, sendo consideradas sementes com apenas plântulas clonais. Uma destas plântulas ainda foi idêntica à de outra semente poliembriônica da mesma mãe. Quatro sementes monoembriônicas apresentaram plântulas que diferiram da mãe em dois e três loci, também sendo consideradas clonais. Duas sementes poliembriônicas apresentaram plântulas que diferiram em um ou dois loci e outras em 21 e 22 loci da mãe, evidenciando a coexistência de embriões sexuais e possíveis embriões adventícios na mesma semente. Um caso inesperado de duas plântulas idênticas entre si que diferem da planta mãe em 10 loci pode indicar a presença de clivagem de um embrião sexuado, o que não havia sido descrito para Bignoniaceae. Nossos resultados confirmam a ocorrência de clones resultantes de apomixia esporofítica na espécie e demonstram que embriões adventícios podem ocorrer isoladamente ou concomitantemente a embriões sexuais em uma mesma semente.

Palavras-chave: Apomixia esporofítica, clones, diversidade genética em sementes, embriões adventícios, ISSR, sistemas reprodutivos, *Handroanthus ochraceus*

ABSTRACT

According to histological data, polyembryony in *Handroanthus ochraceus* is a sign of sporophytic apomixis, in which sexual embryos appear to coexist with adventitious embryos in the same seed. However, a study of apomictic populations using ISSR molecular markers did not find clones, but a high genetic variability. The aim of this study was to verify whether the progeny of a polyembryonic population of *H. ochraceus* shows clonal and/or sexual seedlings, in order to corroborate the existence of sporophytic apomixis and understand the absence of clones in the previous work with ISSR markers. Five mother plants and their progenies were analyzed using 11 ISSR primers, totaling 33 samples. Sixty four bands were obtained presenting $P = 29.06\%$, $I = 0.155$, $He = 0.104$, and the greater genetic diversity was found within the mother plant sets and their progeny (AMOVA -87% inside x 13% between). The pairs of individuals presented all loci identical or differed from one to 27 loci. Pairs of individuals that differed among one and three loci were considered putative clones, given the possibility of somatic mutations. An individual with all loci identical to the mother plant was found. Two polyembryonic seeds showed their pairs of seedlings differing from none to three loci among each other and in relation to the mother, being considered seeds with only clonal seedlings. One of these seedlings was also identical to another seedling of a polyembryonic seed of the same mother. Four monoembryonic seeds showed seedlings that differed from the mother in two or three loci, also being considered clonal. Two polyembryonic seeds showed seedlings that differed by one or two loci, and other by 21 or 22 loci from the mother, proving the coexistence of sexual and putative adventitious embryos in the same seed. An unexpected case of two seedlings identical to each other, but differing from the mother plant at 10 loci may indicate the presence of a sexual embryo cleavage, which had not been described for Bignoniaceae. Our results confirm the occurrence of clones arising from sporophytic apomixis in the studied species and demonstrate that adventitious embryos can occur isolated or concomitantly with sexual embryos in the same seed.

Keywords: Adventitious embryos, clones, genetic diversity on seeds, ISSR, breeding systems, sporophytic apomixis, *Handroanthus ochraceus*

Sumário

1. Introdução com justificativa	1
1.1 Sistema reprodutivo e número cromossômico em <i>Bignoniaceae</i>	1
1.2 Apomixia e poliembrionia	2
1.3 Variabilidade genética em populações apomíticas de <i>Handroanthus ochraceus</i>	3
2. Objetivos	4
3. Material e Métodos	5
3.1 Coleta de material e germinação de sementes	5
3.2 Extração de DNA	6
3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	7
3.4 Análise dos dados moleculares	8
4. Resultados	9
5. Discussão	14
5.1 Parâmetros de diversidade genética	14
5.2 Variabilidade entre e dentro dos conjuntos de plantas mãe e suas progênes	14
5.3 A existência de embriões supranumerários clones da planta mãe	15
5.4 Sementes monoembriônicas com apenas um possível embrião adventício (clonal) ..	15
5.5 A coexistência de embriões clonais e sexuais em uma mesma semente	16
5.6 Possível caso de múltiplos sacos embrionários em um mesmo óvulo.....	16
5.7 Possível caso de clivagem do embrião sexual	17
5.8 Considerações finais	17
6. Referências Bibliográficas	18

1.Introdução com justificativa

1.1 Sistema reprodutivo e número cromossômico em *Bignoniaceae*

Bignoniaceae é a família na qual *Handroanthus ochraceus* está inserida. Apresenta ampla diversidade e distribuição contendo aproximadamente 827 espécies e 82 gêneros (Olmstead, *et al.*, 2009). Aproximadamente 80% das espécies da família apresenta o sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (LSI) evitando a formação de sementes autofecundadas, o que pode explicar a ampla diversidade de espécies (Gibbs & Bianchi, 1993, 1999; Bittencourt Júnior, 2003). Possui uma variedade de visitantes como abelhas, quiroptéros, aves e mariposas (Gentry, 1974a,b; 1980). O principal agente polinizador para *Bignoniaceae* são as abelhas (Gentry, 1974a,b; 1980), especificamente Euglossini e Centridini, e essas geralmente são atraídas por flores tubulares que apresentam como atrativo principal um néctar concentrado numa câmara nectarífera e uma fragrância adocicada (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 2006).

O número cromossômico mais comum dentre as *Bignoniaceae* é $2n = 40$ (Goldblatt & Gentry, 1979). Há registrado também $2n=36$ em aproximadamente 12% das espécies (Goldblatt & Gentry, 1979; Piazzano, 1998; Sampaio, 2010). No entanto, a poliploidia já foi registrada para *H. serrifolius*, com $2n=120$ (Alves *et al.*, 2013), para *Handroanthus chrysotrichus* (Piazzano, 1998), *Anemopaegma acutifolium*, *A. glaucum*, e *A. scabriusculum* (Firetti, 2011; Sampaio *et al.*, 2013) com $2n=80$ cromossomos. Estas espécies poliplóides foram registradas como apomíticas esporofíticas, poliembriônicas e autoférteis (Bittencourt & Moraes, 2010, Mendes-Rodrigues, *et al.* 2012; Firettiet *et al.*, 2013, Sampaio *et al.*, 2013a e b, Alves *et al.*, 2016). *Handroanthus ochraceus* apresenta citótipos diplóides e poliplóides, apresentando $2n=40$ e $2n=80$, respectivamente (Sampaio, 2010). Esta espécie apresenta uma variedade de sistemas reprodutivos distribuídos em suas

populações. Foram encontradas populações apomíticas esporofíticas, poliembriônicas, poliplóides e autoférteis (Costa *et al.*, 2004; Bittencour & Moraes, 2010; Sampaio, 2010; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012), bem como sexuadas, autoestéreis e diplóides (Gibbs & Bianchi, 1993; Sampaio, 2010).

1.2 Apomixia e poliembrionia

A apomixia é um processo reprodutivo que gera embriões geneticamente idênticos à planta-mãe (clones) no interior das sementes, portanto é um tipo de reprodução assexuada (Richards, 2003). Geralmente, este mecanismo ocorre porque não há uma meiose reducional durante a formação do megagametófito, o que desenvolve oosferas não-reduzidas que podem prosperar e gerar embriões e até mesmo um endosperma autônomo (Richards, 2003). Ainda pode ocorrer pela formação de embriões adventícios a partir dos tecidos somáticos do óvulo, necessitando da fecundação dos núcleos polares para o desenvolvimento do endosperma (Richards, 2003).

A origem celular deste clone determina qual o tipo de apomixia, podendo ser a apomixia gametofítica ou esporofítica (Asker & Jerling, 1992; Richards, 2003). É gametofítica quando advém de um megagametófito não-reduzido, e se subdivide em dois tipos: diplosporia e aposporia. Diplosporia é quando uma célula mãe de megásporo se desenvolve em megagametófito sem meiose e este último gera uma oosfera diplóide que se torna um embrião partenogênético (Asker & Jerling, 1992; Koltunow & Grossniklaus, 2003; Whitton *et al.*, 2008). A aposporia ocorre quando se concebe um megagametófito não-reduzido a partir de células do nucelo concomitantemente a um megagametófito reduzido oriundo da célula-mãe do megásporo, podendo dar origem a sementes poliembriônicas (Koltunow, 1993; Whitton *et al.*, 2008).

É considerada apomixia esporofítica, se o embrião formar-se diretamente de células

do esporófito (sem passar pela fase gametofítica). Neste caso, ele advém de células somáticas do tegumento ou do nucelo, que por mitoses produzem embriões clonais (Koltunow, 1993). Concomitantemente, dentro do óvulo, se origina um megagametófito reduzido (por meiose) que, por sua vez, pode originar um embrião sexual (Koltunow, 1993). Esse tipo de apomixia necessita da polinização e fecundação dos núcleos polares oriundos de um megagametófito reduzido para a formação do endosperma, o qual é responsável pela manutenção dos embriões assexuados e sexuados (Richards, 2003; Whitton *et al.*, 2008), por isso elas ainda podem ser classificadas como auto-férteis ou auto-estéreis, embora as espécies apomíticas sejam predominantemente auto-férteis (Hörandl, 2010). Espécies com apomixia esporofítica também são conhecidas por apresentar sementes poliembriônicas, as quais podem ser constituídas de diferentes embriões clonais ou de embriões clonais e sexuados (Asker & Jerling, 1992, Whitton *et al.*, 2008).

*1.3 Variabilidade genética em populações apomíticas de *Handroanthus ochraceus**

Um estudo anterior avaliou a variabilidade genética entre populações de *H. ochraceus* que apresentam diferenças quanto à ploidia e ao sistema reprodutivo, (apomíticas, auto-férteis, tetraploides X sexuadas, auto-estéreis, diplóides). Sendo que no referido estudo as populações apomíticas foram detectadas através da presença de elevadas taxas de sementes poliembriônicas, enquanto as populações sexuadas foram monoembriônicas (Mendes, 2013). O estudo demonstrou uma estrutura genética distinta entre populações apomíticas e não apomíticas, indicando a presença de diferentes linhagens evolutivas (Mendes, 2013). Tais resultados levam ao questionamento de porque não terem sido detectados possíveis pares de clones nas populações apomíticas adultas e de porque uma variabilidade genética tão elevada.

Acredita-se que uma elevada taxa de embriões sexuados possam se estabelecer no

meio ambiente para justificar a elevada variabilidade genética encontrada em populações apomíticas da espécie (Mendes, 2013). Além disso, é possível que os clones realmente sejam formados, mas que exerçam uma competição acirrada com os embriões sexuais de uma mesma semente, de forma que poucos chegam à maturidade.

O estudo da progênie de populações apomíticas de *H. ochraceus* permitirá confirmar a produção de possíveis clones em populações poliembriônicas, bem como sua coexistência com embriões sexuais, uma vez que estes dados são inferidos através de estudos histológicos até o presente momento. Também permitirá compreender melhor o significado evolutivo e ecológico da apomixia esporofítica na família Bignoniaceae, além de viabilizar ações para a conservação e manejo de suas distintas populações.

2. Objetivos

Avaliar a variabilidade genética da progênie de cinco indivíduos de uma população poliembriônica de *H. ochraceus* localizada em Itumbiara (GO), a fim de verificar a presença de possíveis embriões clonais (apomíticos) e sexuais em sementes poli e monoembriônicas. Assim, será possível inferir se embriões clonais e sexuais podem coexistir em uma mesma semente poliembriônica, e se embriões sexuais podem ou não chegar à maturidade, o que parece duvidoso nos trabalhos de anatomia vegetal já realizados para esta espécie e espécies correlatas (Costa *et al.*, 2004; Bittencourt e Moraes, 2010; Sampaio *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2016). Bem como saber se sementes monoembriônicas são preferencialmente sexuais ou clonais.

3. Material e Métodos

3.1 Coleta de material e germinação de sementes

Foram coletadas sementes de cinco indivíduos de uma população analisada previamente como poliembrionica em outubro de 2015, numa região de Cerrado às margens da rodovia BR-153, município de Itumbiara-GO (18°41'48" S, 49°19'47" W). As sementes de cada indivíduo foram armazenadas separadamente em sacos de papel em geladeira. Além disso, foram coletadas folhas jovens de cada um dos indivíduos para extração de DNA, as quais foram secas em sílica gel.

Para a germinação foram utilizadas caixas Gerbox® forradas com uma camada de algodão e uma folha de papel filtro umedecidas com água destilada. Foram postas para germinar 50 sementes por indivíduo à temperatura ambiente e sob luz natural. A quantidade de sementes germinadas foi:

- Planta-mãe 1: 15 Sementes (sendo 3 poliembrionicas – 20%)
- Planta-mãe 2: 28 sementes (sendo 11 poliembrionicas – 39%)
- Planta-mãe 3: 13 sementes (sendo 2 poliembrionica – 15%)
- Planta-mãe 4: 32 sementes (sendo 13 poliembrionicas – 40%)
- Planta-mãe 5: 18 sementes (sendo 6 poliembrionicas – 33%)

Após a germinação, as plântulas foram transferidas para caixas de poliestireno com vermiculita em casa de vegetação para permitir um melhor desenvolvimento das mesmas. Plântulas de uma mesma semente foram mantidas juntas em uma única célula da bandeja de poliestireno. Após o desenvolvimento de dois pares de folhas, estas foram coletadas para posterior extração de DNA do material fresco. As progênies oriundas das plantas mãe 1 e 3 tiveram apenas duas sementes monoembrionicas analisadas devido à baixa viabilidade das sementes e taxa de sobrevivência das plântulas, enquanto as advindas das plantas mãe 2, 4 e

5 tiveram duas sementes monoembriônicas e três sementes poliembriônicas analisadas, sendo que cada semente poliembriônica gerou duas plântulas. As plantas mãe, sementes e suas progênies foram identificadas com a numeração apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Numeração utilizada para identificar a planta mãe e suas respectivas progênies.

Planta-mãe	Semente	Progênie
1	1.1	1.1.1
	1.2	1.2.1
2	2.1	2.1.1
	2.2	2.2.1
	2.3	2.3.1
	2.3	2.3.2
	2.4	2.4.1
	2.4	2.4.2
	2.5	2.5.1
	2.5	2.5.2
3	3.1	3.1.1
	3.2	3.2.1
4	4.1	4.1.1
	4.2	4.2.1
	4.3	4.3.1
	4.3	4.3.2
	4.4	4.4.1
	4.4	4.4.2
	4.5	4.5.1
	4.5	4.5.2
5	5.1	5.1.1
	5.2	5.2.1
	5.3	5.3.1
	5.3	5.3.2
	5.4	5.4.1
	5.4	5.4.2
	5.5	5.5.1
	5.5	5.5.2

3.2 Extração de DNA

Para as análises moleculares foram utilizadas folhas secas das plantas mãe de cada progênie, bem como as folhas frescas das plântulas. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o kit de extração DNeasy® Plant mini (Qiagen), seguindo recomendações do

fabricante. Uma amostra de 20mg de tecido de folha seca das plantas mãe e dois pares de folhas frescas das progênes foram macerados e pulverizados. O DNA foi ressuspenso e armazenado no tampão de eluição fornecido pelo kit e preservado em freezer a -20°C.

3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizados 11 *primers* de marcadores dominantes *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) já testados para esta espécie por Mendes (2013), os quais estão relacionados na Tabela 2 com as referidas temperaturas de anelamento. Cada Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada com um volume final de 19µL, contendo uma mistura para a reação (Mix PCR) com 13,7 µL de água ultrapura; 2,0 µL de Tampão 10X de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50mM KCl,); 1,5 µL de dNTP (0,21mM dATP, dCTP, dGTP e dTTP, Ludwig); 0,6 µL de primer (0,32 mM,); 0,2 µL de Taq polimerase (1 Unidade, SIGMA com MgCl₂); soro albumina bovina 1µL e 1 µL de DNA extraído. Para cada reação de PCR foi incluído um controle negativo (branco), sem DNA molde, para avaliar possíveis contaminações provenientes dos próprios reagentes. As amplificações por PCR foram conduzidas em termociclador (ThermoScientific – ArktikThermalCycler de 96 poços), seguindo o programa de ciclos: desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos; seguido por 37 ciclos de 1 minuto a 94°C; 2 minutos nas temperaturas de 46°, 47,5° ou 50°C de acordo com o primer utilizado; 2 minutos a 72°C; extensão final por 7 minutos a 72° e 5 a 10 minutos para a redução da temperatura a 4°C.

Após a PCR, o material genético amplificado passou por eletroforese em gel de agarose (Ultra Pure™ Agarose, Invitrogen) a 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 mg/mL), utilizando o tampão de corrida TBE (1M Tris, 0,02M EDTA, 0,89M de Ácido Bórico) com pH 8,0 a uma voltagem constante de 60 V por 4 horas. Para acompanhar a corrida eletroforética e estimar o tamanho das bandas, foram aplicados 2µL de marcador

molecular com 100 pares de base (Ludwig). Logo após a eletroforese o gel foi submetido à luz Ultravioleta (UV) em transiluminador (Compacte Digimage System UVDI-CB-254/312) conectado a câmera (Canon Power Shot G12 12.1 MP) que auxiliou na captura das imagens.

Tabela 2: *Primers* ISSR utilizados para amplificação do DNA de *H. ochraceus* com as respectivas sequências e temperaturas de anelamento.

Primer	Sequência	Temp. Anelamento °C	Número de bandas
Becky	(CA)7YC	50°C	9
AW3	(GA) 7RG	47,5°C	4
Goofy	(GT)7YG	50°C	6
Jonh	(AG)7YC	47,5°C	5
MAO	(CTC) 4RC	47,5°C	5
Omar	(GAG)4RC	47,5 °C	5
UBC 840	(GA)8YT	50°C	6
UBC 880	(GGAGA)3	50°C	4
UBC 898	(CA)6RY	50°C	7
UBC 899	(CA)6RG	50°C	7
UBC 827	(AC) 8G	47,5°C	6
Total			64

Y= C ou T; R=A ou G.

3.4 Análise dos dados moleculares

A partir das imagens obtidas através da digitalização dos géis de agarose, apenas bandas com boa resolução foram analisadas. Foi montada uma planilha no programa Excel contendo todos os dados da análise, atribuindo 1 para presença e 0 para ausência de banda em cada indivíduo para cada um dos *primers*. Com esta planilha foi obtido o índice de diversidade de Shanon (I), porcentagem de bandas polimórficas (P) e heterozigosidade esperada (He) através do programa GeneAlex 6 (Peakall&Smouse, 2006). No mesmo programa foram calculadas a Análise de Variância Molecular (AMOVA) e a Análise de Coordenadas Principais (PCO). Também foi realizada a análise de Multilocus Matches ,

para cada planta mãe e sua progênie isoladamente no mesmo programa, com o objetivo de avaliar o número de loci em que diferem cada um dos pares de indivíduos.

4. Resultados

Foram obtidas 64 bandas utilizando onze *primers* ISSR (Tabela 2). O polimorfismo obtido para todos os indivíduos desta população, incluindo as progênies foi de 29,06%, o Índice de Shannon (I) foi 0,155 e a Heterozigosidade esperada (He) foi de 0,104 (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros de diversidade genética das cinco plantas mãe de *Handroanthus ochraceus* analisadas e suas respectivas progênies baseados em 64 bandas obtidas a partir de 11 marcadores ISSR. P = porcentagem de bandas polimórficas; I = Índice de diversidade de Shannon; He = heterozigosidade esperada; (\pm desvio padrão).

Progênies	P (%)	I	He
1	14,06%	0,083 \pm 0,026	0,057 \pm 0,018
2	39,06%	0,191 \pm 0,033	0,126 \pm 0,023
3	7,81%	0,050 \pm 0,037	0,035 \pm 0,015
4	29,69%	0,158 \pm 0,032	0,106 \pm 0,022
5	54,69%	0,294 \pm 0,037	0,198 \pm 0,026
Média	29,06% \pm 8,47%	0,155 \pm 0,014	0,104 \pm 0,010

Na Análise de Variância Molecular (AMOVA) desta população, foi encontrada maior variação dentro dos conjuntos planta mãe - progênies (87%) do que entre os conjuntos (13%) (Tabela 4).

Tabela 4: Teste AMOVA para cinco plantas mãe de *H. ochraceus* de uma população

poliembriônica de Itumbiara-GO com suas respectivas progênes, totalizando 33 indivíduos com 64 bandas polimórficas utilizando 11 marcadores moleculares ISSR.

Fonte de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes da variância	% total da variância	Valor de p
Entre os conjuntos planta mãe – progênie	4	31,960	8,322	13%	<0,001
Dentro dos conjuntos planta mãe – progênie	28	117,556	12,800	87%	<0,001

Na Análise de Coordenadas Principais (PCO), os dois primeiros eixos corresponderam a 73,57% da variância observada, sendo que o eixo 1 explica 59,15% dessa variância. O eixo 2 explica 14,42% da variância (Figura 1). As progênes das plantas mãe 4 e 5 foram as que apresentaram indivíduos mais distintos do restante da população, apresentando pares de indivíduos que diferiram em mais de 15 loci, enquanto as demais plantas mãe e suas progênes diferiram em no máximo 15 loci (Tabela 5)

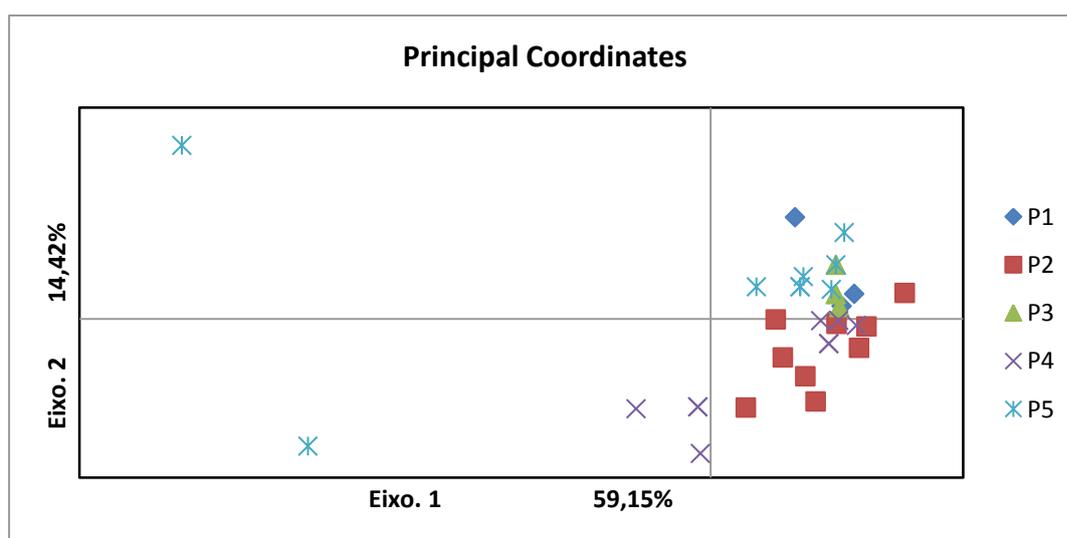


Figura 1: Representação dos pontos nos dois eixos da análise de coordenadas principais (PCO) obtidos a partir da matriz de distância genética baseada em 64 bandas polimórficas

de 11 *primers* ISSR dos 33 indivíduos de *Handroanthus ochraceus*.

Na análise de *Multilocus Matches* os pares de indivíduos diferiram em nenhum locus e no máximo em 27 loci (Tabela 5). Foram encontrados três pares de indivíduos que possuem todos os loci analisados correspondentes, ou seja, não diferem em nenhuma das 64 bandas obtidas (Tabela 5). Um entre a planta mãe e sua progênie de semente poliembriônica (4 e 4.5.2) (Tabela 5). Um entre duas progênies oriundas da mesma semente (4.3.1 e 4.3.2, que diferem da mãe 4 por 10 loci) e outro entre progênies da mesma planta mãe, mas de sementes poliembriônicas distintas (5.4.1 e 5.5.2), que diferiram da planta mãe por um loci (Tabela 5). Além destas, as progênies de sementes poliembriônicas que diferem em um ou dois loci em relação à respectiva planta mãe foram: 4.5.1 e 5.3.2 (Tabela 5). Também foram encontradas distinções de dois e três loci entre as plantas mãe e as seguintes progênies de sementes monoembriônicas: 2.2.1, 3.1.1, 2.1.1 e 4.1.1 (Tabela 5).

Nas sementes poliembriônicas 5.3 e 5.5 houve uma grande discrepância entre os embriões, sendo que os mais próximos da mãe diferiram por 1 e 2 loci (5.5.2 e 5.3.2) enquanto os demais por 21 e 22 loci (5.3.1 e 5.5.1), respectivamente (Tabela 5). Além disto, nas sementes 2.3, 2.4, 2.5 e 4.4, as plântulas emergidas da mesma semente se diferenciaram da planta mãe, de 4 a 10 loci (Tabela 5).

Tabela 5: Análise *Multilocus Matches* comparando cada par de indivíduos.

	Pares de indivíduos			Nº de loci em que diferem os indivíduos
1.	1	X	1.1.1	7
2.	1	X	1.2.1	4
3.	1.1.1	X	1.2.1	7
4.	2	X	2.1.1	3
5.	2	X	2.2.1	2
6.	2	X	2.3.1	6
7.	2	X	2.3.2	5
8.	2	X	2.4.1	8

9.	2	X	2.4.2	9
10.	2	X	2.5.1	4
11.	2	X	2.5.2	8
12.	2.1.1	X	2.2.1	3
13.	2.1.1	X	2.3.1	9
14.	2.1.1	X	2.3.2	6
15.	2.1.1	X	2.4.1	11
16.	2.1.1	X	2.4.2	8
17.	2.1.1	X	2.5.1	7
18.	2.1.1	X	2.5.2	9
19.	2.2.1	X	2.3.1	8
20.	2.2.1	X	2.3.2	3
21.	2.2.1	X	2.4.1	10
22.	2.2.1	X	2.4.2	9
23.	2.2.1	X	2.5.1	6
24.	2.2.1	X	2.5.2	8
25.	2.3.1	X	2.3.2	9
26.	2.3.1	X	2.4.1	8
27.	2.3.1	X	2.4.2	15
28.	2.3.1	X	2.5.1	4
29.	2.3.1	X	2.5.2	14
30.	2.3.2	X	2.4.1	13
31.	2.3.2	X	2.4.2	10
32.	2.3.2	X	2.5.1	7
33.	2.3.2	X	2.5.2	11
34.	2.4.1	X	2.4.2	15
35.	2.4.1	X	2.5.1	6
36.	2.4.1	X	2.5.2	14
37.	2.4.2	X	2.5.1	11
38.	2.4.2	X	2.5.2	9
39.	2.5.1	X	2.5.2	12
40.	3	X	3.1.1	2
41.	3	X	3.2.1	4
42.	3.2.1	X	3.1.1	4
43.	4	X	4.1.1	3
44.	4	X	4.2.1	6
45.	4	X	4.3.1	10
46.	4	X	4.3.2	10
47.	4	X	4.4.1	10
48.	4	X	4.4.2	7
49.	4	X	4.5.1	2
50.	4	X	4.5.2	0
51.	4.1.1	X	4.2.1	3
52.	4.1.1	X	4.3.1	9
53.	4.1.1	X	4.3.2	9
54.	4.1.1	X	4.4.1	11
55.	4.1.1	X	4.4.2	10
56.	4.1.1	X	4.5.1	3
57.	4.1.1	X	4.5.2	3
58.	4.2.1	X	4.3.1	8

59.	4.2.1	X	4.3.2	8
60.	4.2.1	X	4.4.1	10
61.	4.2.1	X	4.4.2	13
62.	4.2.1	X	4.5.1	6
63.	4.2.1	X	4.5.2	6
64.	4.3.1	X	4.3.2	0
65.	4.3.1	X	4.4.1	10
66.	4.3.1	X	4.4.2	11
67.	4.3.1	X	4.5.1	10
68.	4.3.1	X	4.5.2	10
69.	4.3.2	X	4.4.1	10
70.	4.3.2	X	4.4.2	11
71.	4.3.2	X	4.5.1	10
72.	4.3.2	X	4.5.2	10
73.	4.4.1	X	4.4.2	7
74.	4.4.1	X	4.5.1	12
75.	4.4.1	X	4.5.2	10
76.	4.4.2	X	4.5.1	9
77.	4.4.2	X	4.5.2	7
78.	4.5.1	X	4.5.2	2
79.	5	X	5.1.1	7
80.	5	X	5.2.1	4
81.	5	X	5.3.1	22
82.	5	X	5.3.2	2
83.	5	X	5.4.1	1
84.	5	X	5.4.2	3
85.	5	X	5.5.1	21
86.	5	X	5.5.2	1
87.	5.1.1	X	5.2.1	5
88.	5.1.1	X	5.3.1	27
89.	5.1.1	X	5.3.2	9
90.	5.1.1	X	5.4.1	6
91.	5.1.1	X	5.4.2	4
92.	5.1.1	X	5.5.1	24
93.	5.1.1	X	5.5.2	6
94.	5.2.1	X	5.3.1	24
95.	5.2.1	X	5.3.2	6
96.	5.2.1	X	5.4.1	3
97.	5.2.1	X	5.4.2	1
98.	5.2.1	X	5.5.1	21
99.	5.2.1	X	5.5.2	3
100.	5.3.1	X	5.3.2	20
101.	5.3.1	X	5.4.1	21
102.	5.3.1	X	5.4.2	23
103.	5.3.1	X	5.5.1	17
104.	5.3.1	X	5.5.2	21
105.	5.3.2	X	5.4.1	3
106.	5.3.2	X	5.4.2	5
107.	5.3.2	X	5.5.1	19
108.	5.3.2	X	5.5.2	3

109.	5.4.1	X	5.4.2	2
110.	5.4.1	X	5.5.1	20
111.	5.4.1	X	5.5.2	0
112.	5.4.2	X	5.5.1	22
113.	5.4.2	X	5.5.2	2
114.	5.5.1	X	5.5.2	20

5. Discussão

5.1 Parâmetros de diversidade genética

A população apresentou um baixo índice de diversidade genética se comparada com um trabalho anteriormente realizado para a espécie utilizando os mesmos marcadores (Mendes, 2013), sendo que para populações apomíticas encontrou-se: P(%) 66,35%; I 0,341 e He 0,227; e para populações não apomíticas: P(%) 73,08%; I 0,373 e He 0,249 (Mendes, 2013). Este menor índice pode ser explicado devido ao presente estudo ter sido realizado com uma única população com uma amostra de apenas cinco indivíduos, enquanto o de Mendes (2013) utilizou três populações apomíticas e três não apomíticas, com cerca de 20 indivíduos cada.

5.2 Variabilidade entre e dentro dos conjuntos de plantas mãe e suas progênes

A pequena variação, demonstrada pelos resultados da AMOVA, entre cada conjunto de plantas mãe e suas progênes pode ser explicada pelo fato de pertencerem à mesma população, portanto, com maior possibilidade de parentesco. A grande variação dentro de cada grupo composto por planta mãe e suas progênes, pode ser explicada pelos diferentes tipos de embriões (sexuados e apomíticos), sendo que foram encontrados embriões possivelmente clonais e outros possivelmente sexuados, como será melhor discutido na análise de *Multilocus Matches*. A análise de PCO, demonstrou que as plantas mãe 4 e 5 e suas respectivas progênes foram as que apresentaram indivíduos mais distantes do restante

da população, certamente devido a terem havido doadores de pólen com estrutura gênica mais distinta das plantas mãe analisadas no estudo.

5.3 A existência de embriões supranumerários clones da planta mãe

Embora a ocorrência da embrionia adventícia para a espécie seja confirmada com dados histológicos (Costa *et al.*, 2004), apenas um par de planta mãe e progênie possuía todos os loci correspondentes na análise *Multilocus Matches*, o que confirma ser um par de clones. Um dos pares de progênies que possuíram todos os loci correspondentes na análise *Multilocus Matches*, 5.4.1 e 5.5.2, foram plântulas oriundas de sementes distintas, sendo consideradas clones entre si, mas diferiram da planta genitora por um locus. Embora não possamos explicar esta diferença de um locus, acreditamos que estes descendentes são possíveis clones da planta mãe, dada a diferença ser considerada ínfima.

No caso da semente 4.5, as progênies 4.5.1 e 4.5.2 diversificaram por dois e zero loci respectivamente em relação à planta mãe, sendo os dois possíveis clones que devem ter competido com o embrião sexual, já tendo sido sugerida a prevalência do embrião assexual para *Handroantus chrysotrichus* (Bittencour & Moraes, 2010). Algo parecido ocorreu na semente 5.4, na qual os embriões 5.4.1 e 5.4.2 divergiram da planta mãe por um e três loci respectivamente.

5.4 Sementes monoembriônicas com apenas um possível embrião adventício (clonal)

Foram encontradas distinções de dois e três loci quatro plantas mães e suas progênies de sementes monoembriônicas: 2 x 2.2.1, 3 x 3.1.1 e 2 x 2.1.1 e 4 x 4.1.1. Como nos quatro casos tratam-se de sementes monoembriônicas, acredita-se que estas possam originar apenas embriões adventícios (Bittencour & Moraes, 2010; Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012). Sendo assim, a oosfera pode não ter sido fecundada, mas como a

espécie é pseudogâmica, é mais provável que tenha havido competição entre os embriões, tendo o embrião sexual e outros possíveis embriões adventícios sido eliminados ainda no processo de desenvolvimento (Bittencour & Moraes, 2010; Mendes–Rodrigues *et al.*, 2012).

5.5 A coexistência de embriões clonais e sexuados em uma mesma semente

Foram detectadas sementes poliembriônicas em que um embrião difere de um a dois loci da planta genitora, enquanto o outro difere por 21 e 22 loci (sementes 5.3 e 5.5, respectivamente). Isso sugere que um embrião provém de origem assexuada, enquanto o outro de origem sexuada, ambos coexistindo na mesma semente, como sugerido em trabalhos genéricos de apomixia (Koltunow, 1993) bem como em trabalhos de análises histológicas da família Bignoniaceae (Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010, Sampaio *et al.*, 2013b ; Alves *et al.*, 2016).

5.6 Possível caso de múltiplos sacos embrionários em um mesmo óvulo

As progênes das sementes poliembriônicas 2.3, 2.4, 2.5 e 4.4, apresentaram diferenças que variam de 4 a 10 loci em relação à mãe. Nesse caso, a plântula que difere em 4 loci pode ser um possível clone da planta mãe ou ser de origem sexuada. No caso de ser de origem sexuada, ambas as progênes são diferentes entre si e da planta genitora. Este caso de sementes poliembriônicas com ambos embriões de origem sexual pode ser explicado pela possível existência de dois sacos embrionários advindos de dois megagametófitos reduzidos (Carmo-Oliveira 1998; Koltunow 1993; Whitton *et al.* 2008). Já foi encontrada, embora com menor frequência, a existência de dois sacos embrionários em uma mesmo óvulo de duas Bignoniaceae, *Anemopaegma acutifolium* e *Handroanthus serratifolius* (Sampaio *et al.*, 2013b; Alves *et al.*; 2016), indicando que o fenômeno também

possa estar presente em *H. ochraceus*.

5.7 Possível caso de clivagem do embrião sexual

Na semente poliembriônica 4.3 foi encontrado um par de clones entre si (progênies 4.3.1 e 4.3.2), que diferem da planta mãe por 10 loci, o que pode ser um indício de uma clivagem do zigoto ou do embrião sexuado, embora este fenômeno não tenha sido descrito na literatura para a família, mas encontrado em outros grupos de plantas poliembriônicas (Koltunow, 1993).

5.8 Considerações finais

Estudando-se as progênies de uma população apomítica de *H. ochraceus* foi possível verificar a presença de pares clones (com todos os loci correspondentes), o que não havia sido possível em estudo anterior com plantas adultas de populações apomíticas da espécie, nas quais os pares de indivíduos adultos diferiam de 10 a 37 loci (Mendes, 2013). Entretanto, pares de indivíduos com variações de um a três loci também foram considerados clones no presente estudo. Essas ínfimas diferenças genéticas entre mães e progênies possivelmente clonais, podem ocorrer devido a pequenas mutações somáticas nas células (Meeûs, 2007). Considerando que embriões adventícios provêm de células somáticas do nucelo ou tegumento (Koltunow, 1993), esta possibilidade não pode ser descartada. Mudanças no código genético podem ser geradas por uma série de mecanismos moleculares, tais como: erros de replicação mitótica; mutações pontuais; “derrapagens” em sequência não gênicas em *tandem*, que podem inserir ou pagar alguns grupos de nucleotídeos durante a etapa de replicação; e a ação de transposons que podem provocar inversões (Lushai & Loxdale 2002). Nos vegetais, foi registrada a ação dos elementos transponíveis que provocam mutações em regiões de ativação ou dentro dos genes, capazes

de provocar alterações fenotípicas (Kumar & Bennetzen, 1999). De toda forma, são necessários mais estudos para populações apomíticas de *H. ochraceus*, a fim de confirmar se essa diferenciação de poucos loci realmente demonstra o aparecimento de embriões apomíticos.

O presente estudo confirma a presença de embriões sexuais e clonais em uma mesma semente poliembrionica como já sugerido em estudos de histologia de espécies apomíticas de Bignoniaceae (Costa *et al.*, 2004; Bittencourt & Moraes, 2010, Sampaio *et al.*, 2013b; Alves *et al.*, 2016). Entretanto, em alguns casos apenas embriões possivelmente clonais são encontrados tanto em sementes mono quanto em sementes poliembrionicas, indicando que possa haver competição entre embriões e que os embriões adventícios podem prevalecer, como já apontado através de morfologia de embriões maduros (Mendes-Rodrigues *et al.*, 2012) em estudos de histologia (Bittencourt & Moraes, 2010). Em sementes monoembrionicas também foram verificados embriões sexuais, indubitavelmente em sementes oriundas da planta mãe 5, já que diferem da mesma em mais de 20 loci, indicando que em algumas sementes os embriões adventícios podem não se desenvolver ou perder uma competição para o embrião sexual. Os possíveis casos de presença de mais de um saco embrionário e de clivagem do embrião sexual merecem ser analisados com mais cautela, uma vez que os embriões considerados sexuais diferem em no máximo 10 loci da planta mãe e não se sabe em quantos loci (no máximo) embriões adventícios poderiam diferir da planta mãe com análises utilizando marcadores ISSR. Novos estudos envolvendo análises moleculares, talvez utilizando outros tipos de marcadores, podem auxiliar na compreensão destes dados.

6. Referências Bibliográficas

- Alves, M.F.; Duarte, M.O.; Oliveira, P. E.; Sampaio, D.S. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 27, n. 4, p. 714-722, 2013.
- Alves, M.F. *et al.* Sporophytic apomixis in polyembryonic *Handroanthus serratifolius* (Vahl) SO Grose (Bignoniaceae) characterizes the species as an agamic polyploid complex. **Plant Systematics and Evolution**, v. 302, n. 6, p. 651-659, 2016.
- Asker, S.E.; Jerling, L. **Apomixis in Plants**, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992.
- Bittencourt Júnior, N.S. Auto-incompatibilidade de ação tardia e outros sistemas reprodutivos em Bignoniaceae. **Tese de Doutorado**. Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. 2003.
- Bittencourt Júnior, N.S.; Moraes, C.I.G. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae): a histological study of post pollination events. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, p. 59-76, 2010.
- Carmo-Oliveira R. 1998. Estudos embriológicos e aspectos da morfologia floral de Vochysiaceae. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. 151p.
- Costa, M.E.; Sampaio, D.S.; Paoli, A.A.S.; Leite, S.C.A.L. Poliembryonia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 395-406, 2004.
- De Campos Telles, Mariana Pires *et al.* Marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de Loci necessário para a estabilidade da divergência estimada. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 87-95, 2006.
- De Meeûs, Thierry; Prugnolle, Franck; Agnew, Philip. Asexual reproduction: genetics and evolutionary aspects. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 11, p. 1355-1372, 2007.

- Firetti-Leggieri, F.; Costa, I.R.; Lohmann, L.G.; Semir, J.; Forni-Martins, E.R. Chromosome studies in Bignoniaceae (Bignoniaceae): the first record of polyploidy in *Anemopaegma*. **Cytologia**, v. 76, n. 2, p. 185-191, 2011.
- Firetti-leggieri, Fabiana *et al.* Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **Plant Reproduction**, v. 26, n. 1, p. 43-53, 2013.
- Gentry, A. H. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. **Biotropica**, p. 64-68, 1974a.
- Gentry, A. H. Coevolutionary patterns in central American Bignoniaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 61, n. 3, p. 728-759, 1974b.
- Gentry A.H. Bignoniaceae-part I (Crescentiae and Tourrettieae). **Flora Neotropica**. n.25, p. 1-130, 1980.
- Gibbs, P.E.; Bianchi, M.B. Post-pollination events in species of *Chorisia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. **Botanica Acta**, v. 106, p. 64-71, 1993.
- Gibbs, P.E.; Bianchi, M.B. Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of Bignoniaceae with LST: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany**, v. 84, p. 449-457, 1999.
- Goldblatt, P.; Gentry, A.H. Cytology of Bignoniaceae. **Botanical Notiser**, v. 132, p. 475–482, 1979.
- Gottsberger, G.; Silberbauer-Gottsberger, I. Life in the cerrado: a South American tropical seasonal vegetation. **Origin, structure, dynamics and plant use**, v. 1, 2006.
- Hörandl, Elvira. The evolution of self-fertility in apomictic plants. **Sexual plant reproduction**, v. 23, n. 1, p. 73-86, 2010.
- Koltunow, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1425, 1993.

- Koltunow, A. M.; Grossniklaus, Ueli. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 547-574, 2003.
- Kumar, A.; Bennetzen, J. L. Plant retrotransposons. **Annual review of genetics**, v. 33, n. 1, p. 479-532, 1999.
- Kumar, R. Senthil; Parthiban, K. T.; Rao, M. G. Molecular characterization of Jatropha genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular biology reports**, v. 36, n. 7, p. 1951-1956, 2009.
- Lushai, G.; Loxdale, H.D. The biological improbability of a clone. **Genetical research**, v. 79, n. 01, p. 1-9, 2002.
- Mendes, M.G. Variabilidade genética e morfológica em populações de *Handroanthus ochraceus* (Bignoniaceae) com sistemas reprodutivos e ploidias distintos. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. p. 98, 2013.
- Mendes-Rodrigues, C., Sampaio, D. S., Costa, M. E., de Souza Caetano, A. P., Ranal, M. A., Júnior, N. S. B., & Oliveira, P. E. Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 207, n. 4, p. 264-274, 2012.
- Olmstead, R.G.; Zjhra, M.L.; Lohmann, L.G.; Grose, S.O.; Eckert, A.J.A Molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 9, p. 1731-1743, 2009.
- Perez, T.; Albornoz, J.; Dominguez, A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular ecology**, v. 7, n. 10, p. 1347-1357, 1998.
- Peakall, R.O.D.; Smouse. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software

- for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, 2006.
- Piazzano, M. Números cromossômicos em Bignoniaceae de Argentina. **Kurtziana**, v. 26, p. 179-189, 1998.
- Richards, A. J. Apomixis in flowering plants: an overview. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 358, n. 1434, p. 1085-1093, 2003.
- Sampaio, D.S. Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. p. 239, 2010.
- Sampaio, D.S.; Bittencourt Júnior, N.S.; OLIVEIRA, P. G. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma* species (Bignoniaceae) from Central Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 173, n. 1, p. 77-91, 2013.
- Whitton, J.; Sears, C.J.; Baack, E.J.; Otto, S.P. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 1, p. 169-182, 2008.