Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Elementos do sistema reprodutivo de etnovariedades de batata-doce,
provenientes do Vale do Ribeira, SP, Brasil**

Lucielio Manoel da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2008

Lucielio Manoel da Silva
Engenheiro Agrônomo

**Elementos do sistema reprodutivo de etnovariedades de batata-doce,
provenientes do Vale do Ribeira, SP, Brasil**

Orientador:
Prof. Dr. GIANCARLO CONDE XAVIER OLIVEIRA

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

Piracicaba
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Silva, Lucielio Manoel da

Elementos do sistema reprodutivo de etnovarietades de batata-doce, provenientes do
Vale do Ribeira, SP, Brasil / Lucielio Manoel da Silva. - - Piracicaba, 2008.
62 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Batata-doce – Vale do Ribeira (SP) 2. Genótipos 3. Reprodução vegetal 4
Variedades vegetais I. Título

CDD 633.492

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Ao senhor, Geraldo Manoel da Silva, meu avó,
verdadeiro pai, com todo o meu amor pelo
exemplo de vida, amizade e dedicação.

DEDICO

À minha mãe Amara Maria da Silva, meus irmãos (Adriana,
Luciano e Leonildo), aos meus queridos sobrinhos
(Tarciana e Jeremias), pela amizade, companheirismo e
apoio dado em todos os momentos da minha vida.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a todos que, de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho. Creio que os nomes aqui mencionados não contemplam a todos; de antemão peço-lhes desculpas pelo esquecimento.

Ao criador do Universo, por conceder a oportunidade de estar entre as suas criaturas.

A todos os meus familiares, em especial a minha querida mãe, Amara Maria da Silva e ao meu irmão, Luciano Manoel da Silva, os quais sempre estiveram, estão e sempre estarão ao meu lado, apoiando no que for possível.

À CAPES pela concessão da bolsa, sem qual seria difícil a concretização deste trabalho.

Ao Professor Giancarlo Conde Xavier Oliveira, pela orientação e amizade.

A todos os professores do Departamento de Genética, em especial aos professores Mateus Mondin e Elizabeth Ann Veasey pelas valiosas contribuições dadas para o desenvolvimento do trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Genética, em especial ao Técnico de Laboratório, Carlos Alberto Veríssimo, pelo apoio dado em todas as fases do desenvolvimento do experimento.

À Dra. Cynthia Fernandes Pinto da Luz e à Dra. Ângela Maria da Silva Corrêa, pesquisadoras da seção de Dicotiledôneas do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo auxílio nas descrições dos grãos de pólen.

À Dra. Neusa Nogueira, à bióloga Mônica e ao estagiário Renan do Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas do CENA-USP, pelo auxílio nas microfotografias dos grãos de pólen.

A todos os pós-graduandos do curso de Genética e Melhoramento de Plantas, em especial a Maria Aparecida, Onildo Nunes, Carlos Eduardo e Fernando Piotto, pela amizade que construímos.

A todos os pós-graduandos que residiram na Vila da Pós-Graduação, no período de março de 2006 a janeiro de 2008, em especial aos queridos e inesquecíveis amigos, Mário Ávila e Juliete Parra, pelos bons momentos que vivemos.

E, finalmente, a todos os amigos que aqui conheci.

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Morfologia	12
2.1.1 Sistema radicular	12
2.1.2 Caule	12
2.1.3 Folha	12
2.1.4 Flor	13
2.1.5 Fruto e semente	13
2.2 Biologia da reprodução	14
2.2.1 Antese e receptividade do estigma	14
2.2.2 Viabilidade e morfologia polínica	14
2.2.3 Sistema reprodutivo	15
2.3 Citogenética e citotaxonomia	16
2.4 Incompatibilidade genética	17
2.4.1 Sistemas de auto-incompatibilidade	18
2.4.1.1 Sistema gametofítico	18
2.4.1.2 Sistema esporofítico	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Material vegetal	21

3.2 Local e época	21
3.3 Instalação e condução dos experimentos	22
3.4 Métodos	28
3.4.1 Sistema reprodutivo	28
3.4.1.1 Avaliação da Frutificação	28
3.4.1.2 Observação dos tubos polínicos no estigma e estilete	31
3.5 Viabilidade dos grãos de pólen	32
3.6 Morfometria floral	33
3.7 Morfologia polínica	33
4 RESULTADOS e DISCUSSÃO	34
4.1 Abertura das flores	34
4.2 Sistema reprodutivo	34
4.2.1 Avaliação da frutificação	34
4.2.2 Tubos polínicos no estilete	35
4.3 Morfologia polínica	43
4.3.1 Descrição geral	43
4.3.2 Descrição dos padrões	43
4.4 Viabilidade do pólen	47
4.5 Morfometria floral	50
5 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

RESUMO

Elementos do sistema reprodutivo de etnovariedades de batata-doce, provenientes do Vale do Ribeira, SP, Brasil

O presente trabalho teve por objetivos avaliar o sistema reprodutivo de etnovariedades de batata-doce, mais especificamente, determinar quais genótipos são autocompatíveis e quais são compatíveis ou incompatíveis entre si. O sistema reprodutivo foi avaliado em 13 etnovariedades de batata-doce, através da frutificação e da observação *in situ* dos tubos polínicos no pistilo através da técnica de epifluorescência com azul de anilina, em flores submetidas a polinização controlada. Teste de viabilidade dos grãos de pólen foi realizado usando os corantes carmim acético e cloreto de tetrazólio em quatro horários diferentes de coleta (6:00; 8:00; 10:00 e 12:00 h). Visando avaliar alguma associação entre a incompatibilidade e a morfologia floral, foram tomadas medidas de todas as peças florais. A frutificação ocorreu apenas nas flores submetidas à polinização cruzada. Do total de 78 cruzamentos realizado, entre as 13 etnovariedades, 46,15% desses é que ocorreu a frutificação. Tubos polínicos nos pistilos foram verificados nas flores autopolinizadas (em 38,46% das etnovariedades) e nas flores submetidas à polinização cruzada (em 85,90% dos cruzamentos). Esses resultados revelam que a batata-doce possui sistema de reprodução sexual mista. A maioria das etnovariedades apresentou taxa de grãos de pólen viáveis acima de 80% quando corados com carmim, mas quando corados com tetrazólio essa taxa foi abaixo de 70%. Entretanto, a variação na viabilidade do pólen nos quatros horários de coleta foi quase inalterada, em ambos corantes. Todas as variáveis florais mensuradas mostraram-se diferenças significativas no nível de 5% de probabilidade, o que revela polimorfismo floral. Quatro padrões bem definido em relação à posição do estigma e da antera mais alta foi estabelecido; estigma bem acima antera, estigma um pouco acima da antera, estigma no mesmo nível da antera e estigma mais abaixo da antera. Mas, neuma associação foi verificada entre a morfologia floral e a incompatibilidade, os cruzamentos ocorreram entre todos os morfotipos.

Palavras-chave: Biologia reprodutiva; Incompatibilidade; Viabilidade polínica; Morfologia polínica; Cruzamentos

ABSTRACT

Elements of the reproductive system of sweet potato landraces from the Vale do Ribeira, SP, Brazil

The objective of this work was to study the reproductive system of sweet potato landraces – specifically, to determine which genotypes are either self-compatible or self-incompatible and which are either compatible or incompatible among themselves. The reproductive system was studied in 13 landraces of sweet potato, by means of the fruit production and in situ observation of the pollen tubes in the pistil with the epifluorescence technique with aniline blue in hand-pollinated flowers. A viability test was performed using the dyes acetic carmine and tetrazolium chloride in four different collecting times (6:00; 8:00; 10:00 and 12:00 h). In order to detect a possible association between incompatibility and flower morphology, several flower parts were measured. Fruit production occurred only in those flowers subjected to cross-pollination. Among 78 crosses performed between 13 landraces, 46.15% produced fruit. Pollen tubes were observed in the pistils of the self-pollinated flowers of 38.46% of the landraces and of the cross-pollinated flowers of 85.90% of the crosses. These results show that sweet potato has a complex sexual reproductive system. Most landraces had a pollen viability rate over 80% when dyed with carmine, but below 70% when dyed with tetrazolium. However, the variation in pollen viability among the four collecting times was insignificant with either dye. All the flower variables measured showed significant differences at 5% of probability, revealing floral polymorphism. Even within-plant morphological pollen polymorphism, which is rather rare, was found. Four well-defined patterns of the relative position of stigma and highest anther were established: stigma well above the anther; stigma slightly above the anther; stigma at the same level as the anther; and stigma below the anther. However, no association was found between floral morphology and incompatibility patterns. There were successful crosses between all morphotypes.

Keywords: Reproductive biology; Incompatibility; Pollen viability; Pollen morphology; Crosses

1 INTRODUÇÃO

A família Convolvulaceae agrupa aproximadamente 50 gêneros, entre os quais *Ipomoea*, que possui cerca de 700 espécies, de ampla distribuição, com aproximadamente 500 espécies ocorrendo nas Américas, das quais somente a batata-doce tem cultivo de expressão econômica.

A batata-doce (*Ipomoea batatas* L. (Lam.)) é uma espécie sobre cuja origem existem controvérsias. No entanto, o continente Americano é aceito como seu centro de origem (YEN, 1976). O México e a América Central são as regiões que apresentam a maior diversidade genética (SINHA; SHARMA, 1992). Portanto, é provável que o centro de origem da espécie se localize lá.

É uma espécie rústica, sendo cultivada, geralmente, por pequenos agricultores em áreas de baixa fertilidade, o que reduz o seu potencial produtivo (MENDONÇA; PEIXOTO, 1991). Atualmente, é cultivada em mais de 100 países, sendo a Ásia o continente com maior volume de produção e a China, o principal país produtor. Seus tubérculos cozidos ou assados servem à alimentação humana, geralmente como fonte complementar de carboidratos na dieta; a parte aérea pode ser usada como forragem. No Japão, os tubérculos são matéria-prima na produção industrial de amido.

No Brasil, está entre as cinco hortaliças mais cultivadas e consumidas. A região Sul é a maior produtora, com 250.013 toneladas em 2006, seguida da região Nordeste, com 181.470 toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2007). A produtividade nacional ainda é baixa (11,60 ton/ha), mas esse patamar pode ser facilmente elevado para 25 ton/ha com uso de tecnologias adequadas e de cultivares elite.

Sua forma de propagação comercial é exclusivamente vegetativa, sendo a rama nova o órgão mais usado e aconselhado, embora se possam usar também ramos velhos, brotos destacados e batatas brotadas (FILGUEIRAS, 1981). No entanto, mesmo sendo propagada via assexuada, a reprodução sexual foi mantida ativa na espécie, o que contribui para promover a amplificação da variabilidade genética, o que favorece a seleção de genótipos mais produtivos pelos melhoristas.

Porém, é uma espécie pouca explorada em termos de melhoramento genético em que a obtenção de novas variedades se dá, basicamente, com avaliações de clones obtidos através de campos de policruzamentos, o que não tem dado resultados satisfatórios (BUTELER; LANBONTE; MACCHIAVELLI, 1997). O conhecimento aprofundado do sistema reprodutivo é fundamental para a condução de programas de melhoramento de qualquer espécie, já que os métodos empregados diferem de acordo com o sistema de reprodução (BUENO; MENDES; CARVALHO, 2001).

Portanto, é fundamental um estudo para determinar os detalhes do sistema reprodutivo da batata-doce, assim como de suas variações entre populações, especialmente as tradicionais, que são menos conhecidas, para que elas possam ser incorporadas posteriormente em programas de melhoramento.

No Estado de São Paulo, o Vale do Ribeira é uma região que a espécie apresenta ampla variabilidade genética entre as variedades cultivadas pela agricultura tradicional (VEASY et al., 2007). O sistema reprodutivo, em particular genes de auto-incompatibilidade, tem uma considerável probabilidade de apresentar variabilidade também.

Assim, o presente trabalho tem por objetivos determinar o tipo de sistema reprodutivo de etnovariedades de batata-doce, coletadas em roças de agricultura tradicional do Vale do Ribeira, SP - mais especificamente, determinar - quais acessos são autocompatíveis e quais são compatíveis ou incompatíveis entre si.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Morfologia

A batata-doce é uma espécie herbácea, perene (embora cultivada como anual), que apresenta grande variabilidade morfológica (AUSTIN, 1978; HUAMÁN, 1992; VEASEY et. al., 2007). As características básicas dessa espécie, segundo Huamán (1992) são:

2.1.1 Sistema radicular

O sistema radicular é constituído por dois tipos de raízes. As fibrosas, responsáveis pela absorção de nutrientes e água e a sustentação da planta e, as tuberosas, que armazenam produtos fotossintetizados. Sua forma é bastante variada, dependendo do genótipo. O sistema radicular é profundo, podendo chegar a 1,60 m, conferindo à espécie tolerância à seca.

2.1.2 Caule

O caule da batata-doce, também conhecido como haste ou rama, é cilíndrico, glabro ou muito pubescente, de hábito de crescimento rasteiro, ereto ou semi-ereto. O comprimento varia, alcançando até 5 m. Dependendo do genótipo, a coloração varia de verde até totalmente pigmentado com antocianina. O espaçamento entre os entrenós também é bastante variado, até dentro da mesma rama, sendo uma característica bastante influenciada pelas condições ambientais.

2.1.3 Folha

As folhas são simples, dispostas de forma alternada formando uma espiral. A borda do limbo foliar pode ser dentada ou lobada, enquanto que a base, geralmente, tem dois lobos que podem ser retos ou circulares. A coloração e a forma geral do limbo

variam bastante. O número de lobos geralmente varia de 3 a 7, mas alguns genótipos podem apresentar de 0 a 9 lóbulos.

2.1.4 Flor

As flores da batata-doce são hermafroditas, perfeitas, dispostas em inflorescência do tipo cimeira, apresentando variações no tamanho e cor, dependendo da variedade. O cálice consiste de 5 sépalas, sendo duas externas e 3 internas, que permanecem presas mesmo após as pétalas caírem, glabras ou pubescentes. A corola tem 5 pétalas unidas formando um funil. A coloração é variada, desde o branco a diversas tonalidades lilases. O androceu consiste de 5 estames com filamentos de tamanhos desiguais, parcialmente fundidos com a corola. O comprimento dos filetes é variado em relação à posição do estigma. As anteras apresentam deiscência longitudinal. O gineceu consiste de um pistilo com ovário súpero, com dois carpelos e dois lóculos contendo um ou dois óvulos. O estigma é dividido em dois lobos. Na base do ovário, existe uma glândula amarela bem desenvolvida, contendo néctar, que atrai os insetos.

2.1.5 Fruto e semente

Os frutos são do tipo cápsula, mais ou menos redondos, podendo ser pubescentes ou glabros. Apresentam cor marrom quando maduros e podem conter de uma até quatro sementes por fruto. As sementes podem ter formas irregulares ou levemente esféricas, com cor variando do marrom ao preto e têm cerca 3 mm de comprimento. Sua germinação natural é bastante dificultada pela impermeabilidade da testa. No entanto, a germinação pode ser facilitada pelo uso de métodos de escarificação, mecânico ou químico. Não possuem período de dormência e sua viabilidade é mantida por vários anos.

2.2 Biologia da reprodução

A biologia floral é o ramo da biologia reprodutiva que estuda os aspectos da flor que envolvem desde os mecanismos da formação das gemas florais até a fecundação das mesmas (SILVA, 2000).

2.2.1 Antese e receptividade do estigma

A abertura das flores da batata-doce se dá pela manhã, por volta das 5:00 horas, pendurando até o final da tarde, mas em dias com temperaturas amenas pode ocorrer mais tarde e só fechar no outro seguinte (FOLQUER, 1978; JONES, 1980). O conhecimento do horário em que o estigma está receptivo, bem como, o período em que permaneça nesse estágio, é de grande importância para o sucesso da polinização artificial (STONE; THOMSON; DENT-ACOSTA, 1995). A receptividade estigmática é caracterizada por alta atividade enzimática, portanto os métodos empregados medem justamente essa atividade (DAFNI; MAUÉS, 1998).

Terada et al. (2005), observaram que a antese da batata-doce ocorre por volta das 6:00 horas da manhã, durando até as 14:00 horas do mesmo dia. Logo que as flores abrem as anteras já estão deiscentes. Nesse mesmo trabalho os autores verificaram que a receptividade do estigma só começa cerca de 30 minutos depois da antese, persistindo até 1 hora antes do fechamento das flores.

2.2.2 Viabilidade e morfologia polínica

Vários métodos têm sido empregados para se avaliar a porcentagem de pólen viável, alguns diretos e outros indiretos. No primeiro caso, a viabilidade é determinada pela indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro*. No segundo, a viabilidade é avaliada através da coloração dos grãos de pólen, sendo esses os métodos mais utilizados e mais rápidos. Diversos corantes são utilizados para esse fim, tais como: carmim acético, iodeto de potássio, azul de anilina e cloreto de 2,3,5 trifênil tetrazólio

(PEÑALOZA, 2005). O carmim acético é sem dúvida o corante mais utilizado, embora não haja um teste universal que utilize um corante específico para todas as espécies (TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006).

Em batata-doce, na grande maioria dos trabalhos, os autores têm usado o carmim acético para avaliar a porcentagem de pólen viável da espécie. Terada et al. (2005), constataram que a batata-doce apresenta cerca de 98% de pólen viável logo após a antese. Nesse mesmo trabalho os autores observaram que a viabilidade do pólen permanece alta (acima de 80%) até as 13:00 horas. Murata e Matsuda (2003), também utilizando carmim acético, verificaram que a maioria das variedades estudadas apresentava taxa acima de 80% de pólen viável.

A morfologia polínica da batata-doce é típica do gênero *Ipomoea*. Espécies como *I. asarifolia*, *I. aquatica*, *I. batatas*, *I. pandurata* entre outras têm suas morfologias polínicas semelhantes. Os grãos de pólen dessas espécies são grandes, com mais de 60 μ de diâmetro, pantoporados, esferoidal, com poros circulares recobertos por membrana, esta podendo estar recoberta por grânulos ou gemas. A exina semitectada, tectada, microreticulada, metarreticulada, espinhosa, com os espinhos de diferentes formas e tamanhos (ANDRADE; MIRANDA, 1986; SENGUPTA, 1972; TELLERÍA; DANERS, 2003).

2.2.3 Sistema reprodutivo

Os sistemas reprodutivos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos: reprodução sexual e reprodução assexual. A reprodução sexual envolve a união dos gametas, que pode ocorrer de duas maneiras. Os gametas femininos e masculinos podem ser provenientes do mesmo indivíduo, o que se denomina de autopolinização. As espécies que apresentam este mecanismo são classificadas como autógamas. Na grande maioria das plantas com reprodução sexual, os gametas são provenientes de indivíduos diferentes, ou seja, uma planta cede o gameta feminino e a outra, o masculino, o que é chamado de polinização cruzada ou xenogamia, que caracteriza as

plantas alógamas. Algumas espécies são exclusivamente autógamas ou alógamas e algumas podem ainda combinar os dois tipos, o que caracteriza o sistema misto.

A reprodução assexual pode acoplar-se à autogamia e à alogamia, mas muito mais freqüentemente a esta última. Na batata-doce, o sistema reprodutivo misto de alogamia com reprodução vegetativa agiu conservadoramente sobre a evolução da espécie, que ocorre exclusivamente em agroecossistemas. A reprodução vegetativa teve um efeito semelhante ao da apomixia. Enquanto a alogamia incentivada pela auto-incompatibilidade era capaz de gerar variação, esta só era possível na presença de genótipos compatíveis para os cruzamentos. Além disso, a ausência do uso consciente de sementes na propagação da cultura desacelera o surgimento de variantes. A maior parte do progresso genético na história da cultura deve ter surgido pela inclusão aleatória e rara de recombinantes derivados de sementes caídas ao solo e de mutantes somáticos surgidos nos clones cultivados (YEN, 1976).

2.3 Citogenética e citotaxonomia

A batata-doce pertence à seção *Batatas*, do gênero *Ipomoea*, a qual engloba 13 espécies consideradas seus parentes selvagens. Estas espécies estão agrupadas em dois grupos quanto ao genoma, grupos A e B. As espécies do grupo A são todas auto-compatíveis, cruzam-se com todos os membros do grupo e apresentam o mesmo nível de ploidia, $2n=2x=30$. As espécies do grupo B, do qual a batata-doce faz parte, são auto-incompatíveis, mas são compatíveis entre si. Apresentam três grupos de ploidia: diplóide ($2n=2x=30$), tetraplóide ($2n=4x=60$) hexaplóide ($2n=6x=90$) (JONES, 1968; MARTIN; JONES, 1972; MARTIN; JONES; RUBERTE, 1974). Na espécie cultivada, *I. batatas* e em *I. trifida*, mais de um nível de ploidia são relatados. Em *I. batatas* podem ser encontrados genótipos tetraplóides e hexaplóides, embora os cultivares comerciais sejam todos hexaplóides (HUANG; CORKE; SUN, 2002; NISHIYAMA, 1971; SRISUWAN; SIHACHAKR; SILJAK-YAKOVLEV, 2006). Em *I. trifida*, além desses dois níveis descritos para batata-doce, também há genótipos diplóides (NISHIYAMA, 1971; SRISUWAN; SIHACHAKR; SILJAK-YAKOVLEV, 2006).

A origem poliplóide da batata-doce atualmente ainda é motivo de controvérsias. Vários trabalhos têm sido publicados como o objetivo de elucidar tal fato e muitas hipóteses têm sido propostas, as duas mais comumente citadas são descritas abaixo.

1. *I. batatas* (hexaplóide) seria derivada de uma forma hexaplóide de *I. trifida*, surgida pela duplicação da forma triplóide de *I. trifida*, provavelmente estéril. Esta forma 3x de *I. trifida* seria um alopoliplóide resultante do cruzamento de *I. littoralis* (tetraplóide) com *I. leucantha* (diplóide) (NISHIYAMA, 1971) . A capacidade de tuberização ter-se-ia desenvolvido apenas na evolução de *I. trifida* para *I. batatas* (YEN, 1976).
2. Austin (1988) propõe que a batata-doce surgiu da hibridação entre *I. trifida* e *I. triloba*. O cruzamento entre essas duas espécies resultou num ancestral selvagem da batata-doce, ainda não conhecido.

Apesar das controvérsias a respeito da ancestralidade da batata-doce, há um consenso da maioria dos estudiosos no tocante à participação da espécie *I. trifida* na origem da batata. Estudos recentes, baseados em marcadores moleculares confirmam a *I. trifida* como um dos ancestrais da batata-doce (HUANG; CORKE; SUN, 2002; RAJAPAKSE et al., 2004; SRISUWAN; SIHACHAKR; SILJAK-YAKOVLEV, 2006).

2.4 Incompatibilidade genética

Cerca de 72 % das espécies das angiospermas são constituídas por plantas que possuem flores hermafroditas (CRUDEN; LLOYD, 1995), que podem ter sido favorecidas evolutivamente, já que permitem em uma única visita do polinizador, tanto a polinização como a coleta de pólen. Plantas com flores hermafroditas podem favorecer a autopolinização. Isso teria acontecido se sua evolução não tivesse sido acompanhada de mecanismos que impedissem a autofertilização.

Vários mecanismos estruturais e/ou fisiológicos foram desenvolvidos pelas plantas para favorecer a alogamia e evitar a autopolinização. Entre esses a auto-incompatibilidade é considerada o mecanismo mais eficiente, pois nesse, não há

desperdício de esforço reprodutivo, uma vez que os gametas são viáveis e há formação de sementes em todas as plantas (SCHIFINO-WITTMAN; AGNOL, 2002; HISCOCK; TABAH, 2003)

Várias definições são encontradas na literatura para o termo auto-incompatibilidade. No entanto, de forma geral, é conceituada como a incapacidade de uma planta superior, hermafrodita, produtora de gametas férteis, produzir zigotos após ser polinizada com seu próprio pólen ou com pólen de indivíduos relacionados (LUNDQVIST, 1964). É um mecanismo fisiológico de controle genético.

A auto-incompatibilidade já foi descrita em várias espécies das angiospermas, entre elas muitas de interesse econômico. Estima-se que cerca de 60% das espécies apresentam tal mecanismo (HISCOCK; KUES, 1999). O controle genético é exercido, geralmente por um único loco principal (modelo monofatorial), o loco S, com alta diversidade alélica. Em alguns casos, o controle genético é do tipo polifatorial, com dois ou mais locos controlando a auto-incompatibilidade (NETTANCOURT, 2000).

2.4.1 Sistemas de auto-incompatibilidade

A auto-incompatibilidade pode ser classificada por diversas maneiras, porém, dois tipos principais são os mais discutidos pela literatura especializada, o gametofítico e o tipo esporofítico.

2.4.1.1 Sistema Gametofítico

A auto-incompatibilidade gametofítica é o tipo mais comum entre as espécies, presente em famílias como Solanaceae, Rosaceae e Poaceae. Em geral a reação da incompatibilidade ocorre no estilete paralisando completamente o crescimento do tubo polínico do pólen que possui o mesmo alelo presente no tecido diplóide do estilete. A fertilização só é possível quando o alelo presente no pólen for diferente dos alelos presentes no estilete. Outra característica desse tipo de sistema é que, com poucas exceções, as espécies que apresentam tal mecanismo liberam o pólen na forma binucleada (ou bicelular). No entanto, as espécies da família Poaceae fogem à regra,

liberando o pólen na forma trinucleada (ou tricelular) e a ação de auto-incompatibilidade ocorre no estigma (NETTANCOURT, 2000).

A auto-incompatibilidade gametofítica é controlada em geral por um loco multi-alélico, o loco S. Em populações naturais, mais de 200 alelos de incompatibilidade têm sido encontrados em única população, o que contribui para o sucesso reprodutivo das espécies, já que só ocorre a fertilização entre genótipos com alelos diferentes. Modelos mais complexos também são observados, com no caso das Poaceae, em que a incompatibilidade é controlada por dois locos independentes, o loco S e o loco Z, também altamente polimórficos (NETTANCOURT, 1977, 2000).

2.4.1.2 Sistema Esporofítico

A auto-incompatibilidade esporofítica foi primeiramente descrita no início da década de 50 em duas espécies da família Asteraceae: *Crepis foetida* (HUGHES; BABCOCK, 1950) e *Parthenium argentum* (GERSTEL, 1950). Nesse sistema a especificidade da reação incompatível do pólen é determinada pelo genoma diplóide da planta mãe que o originou, ou seja, pelo esporófito. Esse sistema é menos freqüente que o gametofítico, e é relatado para espécies da família Asteraceae, Convolvulaceae e principalmente Brassicaceae, sobre a qual se acumulou a maior quantidade de informações a respeito (HISCOCK; TABAH, 2003)

A reação da incompatibilidade ocorre, geralmente, nas células das papilas do estigma logo após a polinização. Os grãos de pólen incompatíveis não germinam após caírem no estigma ou quando germinam, produzem um tubo polínico que não penetra no estigma. As espécies que apresentam esse tipo de incompatibilidade geralmente liberam os grãos de pólen na forma trinucleada.

A exemplo do que ocorre no sistema gametofítico, o controle genético do sistema esporofítico é determinado por um único loco, o loco S, em muitos casos também multi-alélico. No entanto, ao contrário do que ocorre no sistema gametofítico, indivíduos homozigóticos para esse loco são encontrados normalmente. A ocorrência de

homozigotos deve-se à existência de dominância entre os alelos de S. Um alelo pode estar na presença de outro alelo dominante na antera do doador do pólen, mas estar junto com um alelo recessivo no estigma da planta receptora do pólen, o que permite a união de dois alelos iguais no mesmo zigoto. Outra possibilidade é a inversão de dominância dos alelos nos órgãos masculino e feminino (RICHARDS, 1997; NETTANCOURT, 2000).

A auto-incompatibilidade esporofítica pode estar relacionada a diferenças morfológicas e é classificada, em relação a esse critério, em homomórfica e heteromórfica (RICHARDS, 1997). No primeiro, a incompatibilidade ocorre entre genótipos morfológicamente semelhantes. É o mais encontrado entre as espécies que apresentam o sistema esporofítico.

No heteromórfico a incompatibilidade está associada a polimorfismo floral. Geralmente as diferenças envolvem a altura das anteras e do estigma, mas outras estruturas florais podem estar envolvidas, como grãos de pólen maiores, células estigmáticas menores e estigmas de diferentes formas, com diferentes tipos de células ou papilas sobre sua superfície. As espécies distílicas apresentam uma das formas florais com estiletes longos e estames curtos e a outra com estiletes curtos e estames longos. As polinizações compatíveis ocorrem apenas entre as duas formas florais (NETTANCOURT, 1977, 2000; RICHARDS, 1997).

Várias espécies da família Convolvulaceae, incluindo *I. batatas* apresenta o sistema de incompatibilidade do tipo esporofítico, controlado por um único loco multi-alelico (MARTIN, 1970; TOMITA et al., 2004). Kowayama et al., (1994) identificaram 49 alelos diferentes em populações naturais da América Central de *I. trifida*, revelando alto polimorfismo para o alelo S. O sítio onde ocorre a reação de incompatibilidade é o estigma, sendo que o pólen falha na germinação ou, quando há germinação, o tubo polínico falha na passagem do estigma para o estilete, características típicas do sistema esporofítico. Em *I. leucantha* e em *I. trifida*, os alelos exibem uma relação de dominância tanto no estigma como no grãos de pólen (KOWYAMA; SHIMANO; KAWASE, 1980; KOWYAMA et al., 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado no presente estudo foram 22 genótipos de batata-doce, sendo 20 etnvariedades de batata-doce, provenientes de Roças de Agricultura Tradicional do Vale do Ribeira, região sul do Estado de São Paulo, Brasil. Os outros dois genótipos são de procedência diferente das demais, sendo um de Uberlândia/MG e o outro adquirido na feira livre de Piracicaba. Todos os genótipos atualmente fazem parte do Banco de Germoplasma do Departamento de Genética da ESALQ e no presente trabalho serão considerados como etnovariedades.

A escolha das mesmas para o presente estudo foi baseada nas informações disponíveis de fenologia (dados não publicados), onde se procurou selecionar as que florescem abundantemente e têm grandes intersecções no período de florescimento, de modo a facilitar os cruzamentos. As etnovariedades florescem por longos períodos entre março e agosto. Mesmo as mais precoces têm florescimento sobreposto ao das mais tardias. Na Tabela 1 e na Figura 1 são apresentados a identificação e aspectos gerais morfológicos dos genótipos avaliados.

3.2 Local e época

Os experimentos foram conduzidos no Campo Experimental do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – ESALQ/USP, localizada no município de Piracicaba-SP, nas coordenadas 22°43'30" sul e 47°38'00" oeste e altitude de 546 metros, no período de novembro de 2006 a agosto de 2007. Na Figura 2 são apresentados os dados de temperatura e precipitação do período da condução do experimento. De fundamental importância foi a condução de um experimento piloto no ano agrícola anterior (2005-2006), que serviu para treinamento nas técnicas usadas e para a prevenção de problemas que poderiam surgir na condução do experimento definitivo no ano seguinte. Nesse experimento

piloto, pode-se familiarizar com as épocas e horários de florescimento de cada variedade e estabelecer os melhores procedimentos para o preparo das flores para os cruzamentos.

3.3 Instalação e condução dos experimentos

O estudo foi constituído de dois experimentos: um nas condições de campo e um na casa de vegetação. Em ambos foram utilizadas as mesmas 22 etnovariedades. A propagação das etnovariedades foi realizada pelo método de multiplicação rápida (BRUNE; SILVA; FREITAS, 2005), que consiste em pré-enraizar pedaços de ramas-ementes com apenas dois nós. As ramas-ementes foram colocadas para enraizar em bandejas de isopor de 72 células, preenchidas com substrato orgânico Plantimax. Em cada célula foi colocado um pedaço de rama-semente contendo dois nós (Figura 3). O plantio das etnovariedades foi realizado em 25 de novembro de 2006, para o experimento nas condições de campo e 05 de dezembro do referido ano para o experimento nas condições de casa de vegetação. Nessas duas ocasiões, as ramas-semente apresentavam três ou quatro folhas (Figura 3).

O experimento de campo foi composto de cinco canteiros com 40 metros de comprimento e 1,2 metros de largura (Figura 4). Os dois canteiros das extremidades constituíram a bordadura. Nos três canteiros centrais foram cultivadas as etnovariedades, sendo que em cada canteiro foram plantadas as 20 etnovariedades espaçadas a 2,0 metros uma da outra, mas uma planta de bordadura em cada extremidade. Assim, cada etnovariedade foi representada por três plantas. Duas das etnovariedades (DGB 39.0 e DGB 73.0) não foram plantadas juntas com as demais, foram aproveitadas as plantas que estavam no banco de germoplasma, localizado próximo ao experimento.

No experimento de casa de vegetação, o plantio foi realizado em baldes plásticos de 4 litros de capacidade preenchidos com uma mistura de solo com esterco de aves, na proporção 3:1, previamente esterilizada. Nesse experimento, cada etnovariedade foi representada por duas plantas. A razão de uso, em ambos experimentos, das

repetições foi apenas a de fornecer uma quantidade maior de flores de cada genótipo, pois a unidade de estudo foi a flor, não a planta.

Durante o período do estudo, foram realizados os tratamentos culturais recomendados para a cultura da batata-doce (FOLQUER, 1978).

Tabela 1 - Identificação das 22 etnovariedades usadas nos experimentos

Identificação no experimento	Identificação no Banco de Germoplasma	Município de procedência
1	DGB 1.2	Iguape
2	DGB 5.3	Iguape
3	DGB 5.4	Iguape
4	DGB 5.5	Iguape
5	DGB 5.7	Iguape
6	DGB 6.1	Iguape
7	DGB 10.0	Iguape
8	DGB 18.0	Iguape
9	DGB 26.0	Iguape
10	DGB 29.0	Piracicaba
11	DGB 42.0	Cananéia
12	DGB 32.0	Cananéia
13	DGB 38.0	Cananéia
14	DGB 43.0	Cananéia
15	DGB 44.0	Cananéia
16	DGB 45.1	Cananéia
17	DGB 46.0	Cananéia
18	DGB 51.0	Cananéia
19	DGB 53.0	Cananéia
20	DGB 55.0	Cananéia
21	DGB 39.0	Cananéia
22	DGB 73.0	Uberlândia/MG

Figura 1 - Aspectos morfológicos das 22 etnovariiedades usadas nos experimentos. As etnovariiedades estão na ordem seqüencial apresentadas na tabela anterior (da esquerda para direita de cima para baixo)

Figura 2 – Dados de precipitação e temperatura entre os meses de dezembro de 2006 e julho de 2007.
Fonte: ESALQ/Posto meteorológico

Figuras 3 -. Propagação das etnovarietades de batata-doce. **A** - Ramas-sementes com apenas dois nós.
B - Mudanças no estágio de plantio

Figura 4 - Vista geral da área do experimento em campo. **A** - Área experimental na época do plantio. **B** - Experimento 100 dias após o plantio

3.4 Métodos

3.4.1 Sistema reprodutivo

Para determinação do sistema reprodutivo das etnovariedades foram utilizadas duas metodologias, consideradas complementares, diferenciando-se apenas na forma de avaliação.

3.4.1.1 Avaliação da Frutificação

O sistema reprodutivo foi determinado pela avaliação da taxa de frutificação em flores submetidas aos tratamentos de teste de apomixia, polinização cruzada artificial e autopolinização artificial e espontânea.

Para os tratamentos em que era necessária a emasculação (polinização cruzada e teste de apomixia), a mesma foi realizada antes da antese, na tarde anterior à abertura da flor. A emasculação foi realizada mediante a remoção das anteras com auxílio de uma pinça (Figura 5). Depois de emasculados, os botões foram protegidos com sacos de papel para evitar a contaminação por pólen estranho (Figura 5). O procedimento de proteção dos botões florais também foi realizado para os tratamentos que não necessitavam de emasculação, mas precisam evitar a contaminação (autopolinização espontânea). Todos os botões foram identificados por etiquetas, nas quais constavam o teste aplicado, o parental masculino, quando aplicável e a respectiva data da realização. Os botões em pré-antese são facilmente reconhecidos, pois eles são mais desenvolvidos que os demais (Figura 5).

A polinização era realizada no dia seguinte à emasculação. A técnica de polinização é descrita por Jones (1980) e foi aplicada entre março e julho de 2007. Para o tratamento de polinização artificial, a polinização se deu com pólen proveniente das outras variedades, à medida que o florescimento destas o permitia e para o tratamento de autopolinização artificial, a polinização foi realizada com pólen da própria flor. Em

ambos os tratamentos, logo após a polinização, as flores foram novamente protegidas para não ocorrerem contaminações. A polinização foi realizada de março a julho de 2007, entre 5:30 e 8:30 h, logo após a abertura da flor, mas, por motivos práticos, nunca quando as flores abriam após as 9:00 (v. item 4.1. para comentário).

O número de flores usadas em cada tratamento variou. Para os tratamentos de apomixia, autopolinização natural e artificial foram usadas dez flores para cada genótipo. Para o teste de polinização cruzada, foi realizado um cruzamento dialélico completo entre as etnovariedades, sem reciprocidade, com o número de flores polinizadas variando conforme as etnovariedades envolvidas, uma vez que a quantidade de flores produzidas por cada genótipo foi diferente. A frutificação foi avaliada dez dias depois de as flores serem polinizadas.

Figura 5 – Processo de emasculação. **A** - Botão floral em pré-antese (BF=Botão floral). **B** - Emasculação do botão em estágio pré-antese. **C** - Botão floral emasculado protegido com saco de papel para não ser contaminado com pólen indesejável

3.4.1.2 Observação dos tubos polínicos no estigma e no estilete

O sistema reprodutivo foi avaliado, também, pela observação da presença ou ausência de tubos polínicos no estilete. Para tanto, quatro flores de cada genótipo foram submetidas aos tratamentos de polinização cruzada e de autopolinização artificial. A técnica de emasculação e polinização foi a mesma descrita no item anterior e, o procedimento foi realizado no laboratório.

Os botões florais foram coletados em estágio de pré-antese e mantidos em recipientes com água até a coleta dos pistilos. Após 4 horas da polinização os pistilos foram coletados e fixados em Carnoy (3:1 álcool etílico: ácido acético), mantidos neste por cerca de 24 horas para posteriores observações em microscópico pela técnica de coloração de Martin (1959) modificada (o trabalho original usa como fixador o FAA) usando epifluorescência com azul de anilina (KEARNS; INOUE, 1993). Antes das análises os pistilos fixados foram submetidos ao seguinte procedimento:

1. Lavagem com água destilada;
2. Submersão numa solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M por um período de 2 horas para desnaturação;
3. Nova lavagem em água destilada.
4. Submersão em tubos eppendorf contendo uma solução de 0,5% de azul de anilina (para 100 mL - 10 mL glicerina + 710 mg K_2PO_4 + 500 mg de azul de anilina + H_2O qsp), por duas horas.
5. Finalmente, os estiletes são depositados sobre lâminas e depois de corados com duas gotas da solução do azul de anilina, são cobertos com uma lamínula e esmagados.

As avaliações foram realizadas no Microscópio de Fluorescência do Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ.

3.5 Viabilidade dos grãos de pólen

Para a estimativa da viabilidade do grão de pólen utilizaram-se dois tipos de testes:

1. Coloração com carmim acético a 1%:
2. Coloração com cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio (TTC), através da técnica descrita por Stanley e Linskens (1974), com solução contendo 1 % de TTC diluído em tampão tris HCl 0,15M, pH 7,8.

Os grãos de pólen corados com o carmim acético assumem uma coloração avermelhada quando viáveis e os que não apresentam essa coloração são inviáveis. Já os grãos de pólen corados com TTC, assumem uma coloração rosa suave quando viáveis e ficam transparentes quando não viáveis.

As observações da quantidade de grãos viáveis e inviáveis por genótipo foram realizadas logo após a preparação das lâminas coradas com carmim acético. Já as lâminas coradas com TTC, requerem um lapso de tempo para que ocorra a reação enzimática e só foram avaliadas 24 horas após seu preparo. As avaliações foram realizadas em microscópio óptico, utilizando a objetiva de 40X.

A viabilidade dos grãos de pólen foi avaliada em quatro horários diferentes de coleta no campo (6:00; 8:00; 10:00 e 12:00 horas) ao longo do dia, para ambos os corantes. Em cada lâmina contaram todos os grãos de pólen presentes.

Visando avaliar o potencial dos dois corantes em distinguir entre pólen viável e inviável, uma lâmina de cada corante foi preparada com grãos de pólen submetidos à temperatura de 48° C durante 24 horas. Nesse experimento foram contados 200 grãos de pólen em cada lâmina.

Foi realizada uma análise estatística no Programa SAS, para verificar se havia diferença significativa entre as etnovariedades. Como o experimento não foi composto por repetições, a interação etnovariabilidade x horário não pôde ser avaliada, servindo como resíduo.

3.6 Morfometria Floral

Considerando que o sistema de incompatibilidade esporofítica pode possuir associação com polimorfismo morfológico, foi investigado que tal associação existia entre as etnovariedades estudadas através de dados morfológicos (floral e polínico).

Para a determinação das medidas das peças florais, 10 flores de cada genótipo foram coletadas e mensuradas. Foram tomadas medidas de comprimento e diâmetro da corola, comprimento do cálice e altura do estigma e das anteras. As medidas foram realizadas com auxílio de um paquímetro com precisão de 0,01 mm. As variáveis foram testadas para detectar diferenças significativas entre as etnovariedades. Quando o F foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, para tal, utilizando-se o programa estatístico SAS.

3.7 Morfologia polínica

A morfologia polínica foi estudada analisando ultramicrofotografias da exina dos grãos de pólen das etnovariedades. Logo após a abertura das flores duas anteras de cada etnovarietade foram coletadas e delas foram retirados os grãos de pólen. Os grãos de pólen removidos das anteras eram depositados num suporte denominado stub, o qual continha uma fita adesiva dupla-face. Em seguida o stub com os grãos de pólen aderidos era metalizado com ouro, observado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura. As observações foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da ESALQ e a terminologia morfológica adotada nesse trabalho foi a proposta por Barth e Melhem (1988), consultando-se a de Punt *et al.*, (2007), em inglês, para atualização dos termos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os experimentos do sistema reprodutivo e da viabilidade polínica, os resultados que serão apresentados foram coletados em 13 etnovariedades do experimento de campo. Para o de morfometria floral, os dados são provenientes de apenas 12 genótipos e para os de morfologia polínica de 18 etnovariedades. Para o experimento instalado na casa de vegetação não houve florescimento das etnovariedades. Algumas etnovariedades do experimento de campo também não floresceram, enquanto que outras, apesar de terem florescido, produziram uma quantidade de flores insuficiente para testar os tratamentos propostos, principalmente o do sistema reprodutivo.

4.1 Abertura das flores

O horário da antese decresceu com o aumento da temperatura ambiental, que tem um efeito retardador sobre a fisiologia floral. Nos dias mais quentes, as flores abriram por volta das 5 horas da manhã e nos dias em que, pela manhã, a temperatura esteve abaixo de 15º C, as flores abriram entre as 9 e 14 h. Na Figura 6 é apresentada, como exemplo, a variação da temperatura registrada para o mês de maio de 2007. As flores que abriram às 5 horas permaneceram abertas até o final do mesmo dia, ao passo que as que abriram mais tarde demoraram até dois dias para fechar. Tais observações são de grande importância prática, principalmente em programas de melhoramento em que a prática de polinização é freqüente.

4.2 Sistema reprodutivo

4.2.1 Avaliação da Frutificação

Não foi observado o desenvolvimento de frutos nas flores submetidas aos tratamentos de apomixia, autopolinização artificial e espontânea.

Para o tratamento de polinização cruzada foi realizado um total de 78 cruzamentos entre as 13 etnovariedades, num dialélico completo sem recíproco. A frutificação foi observada em 36 combinações, o que corresponde a 46,15 % do total. A taxa de frutificação entre os cruzamentos foi bastante variável (Tabela 2). A menor taxa ocorreu no cruzamento entre a etnovariedade DGB 26.0 e a etnovariedade DGB 38.0, que foi de 6,25%. Em apenas dois cruzamentos (entre as etnovariedades DGB 10.0 x DGB 18.0 e DGB 18.0 x DGB 73.0) é que 100% das flores polinizadas formaram frutos. Nos cruzamentos em que foi observada a frutificação, os genótipos envolvidos podem ser considerados compatíveis entre si, contendo alelos que conferem tal compatibilidade. Os cruzamentos em que não se observou a formação de frutos (em 42 combinações) foram agrupados, formando 8 grupos (Tabela 3), mas sobre esses cruzamentos, não é possível afirmar que os genótipos sejam incompatíveis (tomando-se a definição estrita do termo, i.e., aquela em que o mecanismo age no estigma ou no estilo) entre si, pois outros fatores dificultam ou impedem a formação de frutos em batata-doce (apresentados no próximo item).

4.2.2 Tubos polínicos no estilete

Os mesmos cruzamentos realizados para observar a frutificação foram realizados para avaliar a presença ou ausência dos tubos polínicos no estilete. Como a batata-doce é uma cultura que apresenta o tipo de incompatibilidade esporofítica, tendo o estigma como sitio da reação da incompatibilidade, impedindo a germinação do pólen, ou, quando este germina, impedindo sua penetração no estigma, a presença de tubo polínico no estilete só é possível entre cruzamentos compatíveis.

Tanto no tratamento de autopolinização como no de polinização cruzada verificou-se a presença de tubos polínicos no estilete após quatro horas da polinização (Figura 7).

No tratamento de polinização cruzada foram observados tubos polínicos em 85,90 % dos cruzamentos, que corresponde a 67 combinações do total de 78 (Tabela 4). Esses resultados revelam uma grande diversidade alélica para o loco S. A

diversidade alélica para outros locos na batata-doce tem sido relatada em vários trabalhos. Em parte, a diversidade da batata-doce pode ser explicada pelo fato de ser uma espécie poliplóide propagada assexuadamente, o que mantém a heterozigosidade, além de possuir o sistema sexual ativo, que cria a heterozigosidade. As características da agricultura tradicional, em que várias variedades são cultivadas na mesma roça, os recombinantes novos são mantidos e os lavradores têm apreço pela variabilidade, favorecem a manutenção da diversidade. Os cruzamentos em que os grãos de pólen não germinaram ou os tubos polínicos não penetraram no estilete, em apenas 11 combinações, formaram apenas dois grupos de incompatibilidade (Tabela 4). Cinco etnovariedades (26.0; 46.0; 53.0; 55.0; e 39.0) apresentaram tubos polínicos no estilete depois de autopolinizadas (Tabela 4), sendo, portanto, autocompatíveis.

Três dessas etnovariedades (46.0, 55.0 e 39.0) foram também compatíveis com as demais (Tabela 4). Tal fato pode ser explicado admitindo uma hipótese de desligamento do sistema de incompatibilidade nesses genótipos, talvez através de mutação. A mutação teria desabilitado o sistema de incompatibilidade inteiro. Como o mecanismo de autoincompatibilidade é o mesmo tanto em autopolinizações como em cruzamentos, a hipótese é bastante plausível. Mais difícil de explicar é o fenômeno apresentado pelas outras duas variedades (26.0 e 53.0), que são autocompatíveis, mas incompatíveis em alguns cruzamentos. Nelas, o sistema parece não ter degenerado, pois ainda impede alguns cruzamentos. Em plantas de algumas espécies com sistema de autoincompatibilidade normal, autopolinizações podem ainda assim ser bem sucedidas se a polinização é realizada no final do período de abertura da flor, quando, aparentemente, algumas substâncias envolvidas no mecanismo de autoincompatibilidade começam a degenerar. Como não se registraram os horários de polinização individuais, essa hipótese precisa ser testada com novos experimentos.

Os resultados revelam polimorfismo alélico para a incompatibilidade, principalmente no experimento em foi observado o desenvolvimento do tubo polínico. Portanto, essa diversidade alélica não se reflete em sucesso reprodutivo, com muitos cruzamentos entre genótipos compatíveis não frutificando. Quando comparadas as duas metodologias, verifica-se que a frutificação só ocorre em cerca de 50% dos

cruzamentos considerados compatíveis. Então outro(s) fator(es) que não a incompatibilidade podem estar envolvidos de forma a impedir o desenvolvimento dos frutos após cruzamentos entre genótipos compatíveis. Vários fatores são apontados como responsáveis pelo insucesso reprodutivo da batata-doce, como anormalidade meiótica (formação de multivalentes, translocação e deleções), esterilidade e abortamento de zigotos (MAGOON; KRISHNAN; BAIL, 1970; MARTIN, 1970; MARTIN; CABANILLAS, 1966; ORACION; NIWA; SHIOTANI, 1990; TING; KEHR, 1953). Diante de tantas anomalias presentes na batata-doce, a incompatibilidade parece não ser o principal mecanismo que dificulta a frutificação. De fato, Murata e Mutsada (2003), concluíram que a alta percentagem de sacos embrionários anormais é a causa principal da baixa taxa de frutificação em batata-doce. A observação dos autores pode explicar os resultados do presente trabalho, já que, em cruzamentos compatíveis, onde se verificaram tubos polínicos chegando próximo ao ovário, não ocorreu frutificação. A etnovariedade DGB 53.0 parece ser aquela que apresenta alelos comuns a outras etnovariedades, já que, na maioria dos cruzamentos incompatíveis (5 dos 11), ela foi um dos progenitores.

Figura 6 - Temperaturas mínimas e máximas ocorridas no mês de maio de 2007. Fonte: ESALQ/Posto meteorológico.

Tabela 2 - Número de flores polinizadas, número de flores fecundadas (com ao menos uma semente) e % de frutificação nos 36 cruzamentos em que se observou o desenvolvimento de frutos.

Cruzamentos (♂ x ♀)	Número de flores polinizadas	Número de flores fecundadas	% de flores fecundadas
DGB 10.0 x DGB 18.0	10	10	100,00
DGB 10.0 x DGB 26.0	10	09	90,00
DGB 10.0 x DGB 29.0	12	02	16,67
DGB 10.0 x DGB 38.0	12	09	75,00
DGB 10.0 x DGB 51.0	12	07	58,33
DGB 26.0 x DGB 18.0	18	05	27,77
DGB 38.0 x DGB 18.0	08	06	75,00
DGB 45.1 x DGB 18.0	12	03	25,00
DGB 51.0 x DGB 18.0	12	03	25,00
DGB 18.0 x DGB 39.0	10	05	50,00
DGB 18.0 x DGB 73.0	08	08	100,00
DGB 38.0 x DGB 26.0	16	01	6,25
DGB 39.0 x DGB 26.0	08	04	50,00
DGB 73.0 x DGB 26.0	08	06	75,00
DGB 29.0 x DGB 38.0	09	03	33,33
DGB 29.0 x DGB 45.1	10	02	20,00
DGB 29.0 x DGB 51.0	07	01	14,28
DGB 29.0 x DGB 39.0	10	03	30,00
DGB 45.1 x DGB 38.0	06	01	16,67
DGB 39.0 x DGB 38.0	05	03	60,0
DGB 44.0 x DGB 45.1	08	02	25,00
DGB 73.0 x DGB 44.0	10	03	30,00
DGB 45.1 x DGB 46.0	10	03	30,00
DGB 45.1 x DGB 51.0	06	01	16,67
DGB 45.1 x DGB 55.0	10	03	30,00
DGB 45.1 x DGB 39.0	08	04	50,00
DGB 45.1 x DGB 73.0	08	04	50,00
DGB 46.0 x DGB 55.0	05	02	40,00
DGB 39.0 x DGB 46.0	06	01	16,67
DGB 53.0 x DGB 51.0	08	01	12,50
DGB 55.0 x DGB 51.0	09	01	9,09
DGB 73.0 x DGB 51.0	08	03	37,50
DGB 53.0 x DGB 39.0	06	01	16,67
DGB 53.0 x DGB 73.0	10	03	30,00
DGB 73.0 x DGB 55.0	05	01	20,00

Tabela 3 - Agrupamentos das etnovariedades em que não houve frutificação após a polinização cruzada. Quadrículas pretas = não frutificaram; quadrículas brancas = frutificaram. Ex. a DGB 10.0 não frutificou quando cruzada com as DGBs 45.1, 46.0 ou 53.0.

Etnovariedades	Grupos							
	G 1	G2	G3	G 4	G 5	G 6	G 7	G 8
	45.1; 46.0; 53.0	55.0; 44.0	44.0; 46.0; 53.0; 55.0	51.0	53.0	55.0	73.0	29.0
10.0								
18.0								
26.0								
29.0								
38.0								
44.0								
45.1								
46.0								
51.0								
53.0								
39.0

Figura 7 – Tubos polínicos no estilete. **A** – Germinação de grãos de pólen no estigma após a polinização entre genótipos compatíveis. **B** - Tubos polínicos no estilete em cruzamento compatível. **C** - Ausência de tubos polínicos no estilete em cruzamentos incompatíveis. **D** – Pólen não germinado no estigma em cruzamento entre genótipos incompatíveis.

Tabela 4 - Resultados da presença ou ausência de tubos polínicos no estilete em flores submetidas a auto inter- polinização em 13 etnovariedade de batata-doce

Etnovariedades													
	DGB 10.0	DGB 18.0	DGB 26.0	DGB 29.0	DGB 38.0	DGB 44.0	DGB 45.1	DGB 46.0	DGB 51.0	DGB 53.0	DGB 55.0	DGB 39.0	DGB 73.0
DGB 10.0	-	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	-
DGB 18.0		-	+	-	+	+	+	+	+		+	+	+
DGB 26.0			+		+		+	+			+	+	+
DGB 29.0				-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DGB 38.0					-	-	+	+	+		+	+	+
DGB 44.0						-	+	+	+	+	+	+	+
DGB 45.1							-	+	+		+	+	+
DGB 46.0								+	+	+	+	+	+
DGB 51.0									-	+	+	+	+
DGB 53.0										+	+	+	+
DGB 55.0											+	+	+
DGB 39.0												+	+
DGB 73.0													-

+ cruzamentos compatíveis; - cruzamentos incompatíveis.

Grupo 1 de incompatibilidade

Grupo 2 de incompatibilidade

4.3 Morfologia polínica

A descrição da morfologia polínica foi realizada em 18 etnovariedades, as quais envolvem as 13 usadas nos experimentos do sistema reprodutivo.

A ornamentação da exina mostrou-se bastante variada, de forma que nove padrões distintos foram estabelecidos. As etnovariedades avaliadas apresentaram mais de um padrão na mesma planta. Nenhuma relação pôde ser estabelecida entre padrões de incompatíveis e morfologia polínica.

4.3.1 Descrição Geral

Os grãos de pólen da batata-doce são estenopolínicos, de tamanho grande a muito grande; forma esferoidal; pantoporados, com poros circulares recobertos por membrana apertural psilada ou granulada e, ladeados por elevações da sexina que formam arestas geométricas, proeminentes ou não. Exina tectada granulada, com espinhos supratectais, bulbosos, de alturas variáveis e, com porção mediana variando em comprimento, sustentados por columelas distintas e distribuídos sobre as arestas.

4.3.2 Descrição dos padrões

Padrão 1 (Figuras 8A e 8B)

Arestas proeminentes, tetragonais e onduladas, recobertas por poucos grânulos. Membrana apertural recoberta por poucos grânulos. Espinhos localizados sobre os cantos das arestas. Espinhos com porção mediana longa.

Padrão 2 (Figura 8C)

Arestas pouco proeminentes, recobertas por muitos grânulos. Membrana apertural recoberta por muitos grânulos. Espinhos localizados sobre os cantos das arestas. Espinhos com porção mediana curta.

Padrão 3 (Figuras 8D e 8E)

Arestas pouco proeminentes, recobertas por poucos grânulos concentrados principalmente, ao redor da base dos espinhos. Membrana apertural psilada. Espinhos localizados sobre os cantos das arestas. Espinhos com porção mediana curta e base ligeiramente bulbosa.

Padrão 4 (Figuras 8F e 8G)

Arestas proeminentes, tetragonais e onduladas, recobertas por muitos grânulos. Membrana apertural, recoberta por muitos grânulos. Espinhos localizados sobre os cantos das arestas. Espinhos com porção mediana curta.

Padrão 5 (Figuras 8H e 8I)

Arestas não proeminentes, recobertas por poucos grânulos esparsos. Membrana apertural psilada. Espinhos localizados sobre os cantos das arestas. Espinhos com porção mediana curta.

Padrão 6 (Figura 8J)

Arestas proeminentes, tetragonais e onduladas, recobertas por poucos grânulos esparsos. Membrana apertural, recoberta por poucos grânulos. Espinhos localizados sobre os cantos das arestas. Espinhos com porção mediana curta.

Padrão 7 (Figuras 8L e 8M)

Arestas proeminentes, com padrão geométrico irregular, recobertas por muitos grânulos. Membrana apertural, recoberta por muitos grânulos. Espinhos maiores

localizados sobre as arestas, mas sem apresentar um padrão regular de distribuição. Espinhos menores entre espinhos maiores com porção mediana muito longa.

Padrão 8 (Figuras 8N e 8O)

Arestas proeminentes, tetragonais e onduladas, recobertas por muitos grânulos. Membrana apertural, recoberta por muitos grânulos. Espinhos maiores localizados sobre as arestas, mas sem apresentar um padrão regular de distribuição. Espinhos menores com porção mediana muito curta entre espinhos maiores com porção mediana longa.

Padrão 9 (Figuras 8P e 8Q)

Arestas proeminentes, tetragonais, reticulado-granuladas. Membrana apertural recoberta por poucos grânulos. Espinhos maiores localizados sobre os cantos das arestas. Espinhos menores e gemas esparsadas entre os espinhos maiores com porção mediana muito longa.

Os resultados aqui descritos demonstram grande variabilidade na ornamentação da sexina dos grãos de pólen das etnovarietades de batata-doce o que confirma o que já é conhecido para outros caracteres morfológicos e, também, moleculares. Em algumas espécies do gênero *Ipomoea* também tem sido observada variação intra-específica na morfologia polínica, principalmente na forma e tamanho dos espinhos. A natureza poliplóide, a forma de propagação e o sistema de cultivo da batata-doce podem em parte explicar tal variação.

Figura 8 - Padrões de ornamentação da exina dos pólen das etnovarietades de batata-doce. **A e B** – Padrão 1. **C** – Padrão 2. **D e E** – Padrão 3. **F e G** – Padrão 4. **H e I** – Padrão 5. **J** – Padrão 6. **L e M** – Padrão 7. **N e O** – Padrão 8. **P e Q** – Padrão 9

4.4 Viabilidade do pólen

Os resultados obtidos no estudo de viabilidade do pólen para os dois corantes estão apresentados na Tabela 5. Para ambos os corantes houve diferenças significativas entre as etnovariedades ao nível de 5% de probabilidade, mas não houve diferença na viabilidade do pólen para os quatro horários de coleta em que foram avaliados.

Todas as etnovariedades apresentaram uma alta porcentagem de pólen viável, a maioria acima de 85%, quando corados com carmim acético. A maior porcentagem de pólen viável foi observada, na maioria das etnovariedades, entre os horários das 8:00 e 10:00 horas. No entanto, a variação ao longo do dia não foi acentuada, o que significa que os grãos de pólen de batata-doce permanecem altamente viáveis pelo menos até as 12:00 horas.

Quando corados com TTC, todas as etnovariedades estudadas apresentaram menor porcentagem de grãos de pólen viável do que quando corados com carmim. Mesmo, assim a taxa de viabilidade foi acima de 40 %, na sua maioria. A maior taxa de pólen viável foi apresentada, pela maioria das etnovariedades, entre os horários das 6:00 e 8:00 horas, embora a variação na viabilidade ao longo do dia tenha sido pouca, significando que os grãos de pólen realmente mantêm a viabilidade quase que inalterada das 6 às 12 horas. A etnovarietade DGB 26.0 apresentou a menor taxa de pólen viável no horário em que foram realizados os cruzamentos, 38,32%. Essa porcentagem pode ser considerada alta, levando-se em consideração a grande quantidade de pólen que uma antera produz, não prejudicando, assim, a polinização e, consequentemente, a taxa de fecundação.

Os resultados de viabilidade dos grãos de pólen submetidos à temperatura de 48° C por 24 horas (considerados mortos) estão representados na Figura 09. Quando os grãos de pólen foram corados com carmim acético, 20 % dos mesmos assumiram coloração avermelhada, que caracteriza o pólen viável. Dentre os corados com TTC, 100% dos grãos de pólen não se coloriram, comprovando que estavam mortos. Esses resultados indicam que o carmim superestima a taxa de pólen viável em batata-doce.

Analisando as médias das etnovariedades com os dois corantes, verifica-se claramente que todas apresentaram taxa superior de pólen viável quando coradas com carmim. Os resultados aqui apresentados corroboram os discutidos na literatura sobre a batata-doce, segundo a qual a taxa de viabilidade de pólen é superior a 80% quando se usa a coloração por carmim (MURATA; MUTSUDA, 2003; TERADA et al., 2005). Porém, trabalhos usando o TTC nessa espécie são escassos na literatura. Os resultados do presente trabalho, entretanto, são semelhantes aos encontrados para *Bambusa vulgaris* (KOSHY; JEE, 2001). Nesse trabalho, os autores observaram que, quando os grãos de pólen foram corados com carmim acético, a taxa de pólen viável foi de 71,01%, caindo para 31,01% quando se usou TTC. Vianna et al. (2003), avaliaram corantes com potencial para distinguir entre pólen viável e não viável na espécie *Ricinus communis* e constataram que o TTC não cora pólen inviável, mas o carmim acético mostrou mais de 1% de falsos resultados positivos.

Tabela 5 - Porcentagem de pólen viável de 13 etnovariedades de batata-doce corados com carmim acético e cloreto de tetrazólio, em quatro horários diferentes de coleta. Letras diferentes na coluna significam que houve diferença estatística entre as médias das etnovariedades e na linha entre as médias dos horários de coletas dos grãos de pólen

Etnovariedades	Carmim acético					TTC				
	6 h	8 h	10 h	12 h	Média	6 h	8 h	10 h	12 h	Média
DGB 10.0	88,52	91,43	92,77	90,56	90,82 abc	71,65	82,35	62,79	65,00	70,45 ab
DGB 18.0	87,32	88,89	89,95	90,01	89,04 abc	71,83	73,98	67,01	77,67	72,62 a
DGB 26.0	77,05	81,43	90,58	85,54	83,65 abc	38,32	48,32	48,48	54,07	47,30 cde
DGB 29.0	90,69	96,69	92,31	90,87	92,64 a	50,00	51,22	30,77	32,39	41,10 e
DGB 38.0	59,23	61,33	98,14	80,87	74,89 bc	65,31	73,72	67,8	64,89	67,93 ab
DGB 39.0	91,13	80,5	80,39	79,86	82,97 abc	51,67	52,46	33,00	55,04	48,04 cde
DGB 44.0	89,61	93,2	96,39	94,56	93,44 a	61,26	62,63	58,4	46,59	57,22 abc
DGB 45.1	69,42	67,38	82,08	76,98	73,97 c	60,31	57,40	59,14	51,82	57,17 abcd
DGB 46.0	87,71	97,36	92,08	89,35	91,63 ab	45,55	40,56	45,00	40,65	42,94 de
DGB 51.0	90,36	87,96	76,33	75,65	82,58 abc	54,78	50,57	53,36	65,56	56,07 bcde
DGB 53.0	87,05	93,02	92,62	91,24	90,98 abc	50,55	55,57	54,56	35,99	49,17 cde
DGB 55.0	77,97	87,96	86,36	81,24	83,38 abc	65,77	58,99	60,78	54,98	60,13 abc
DGB 73.0	95,23	96,69	81,37	80,87	88,54 abc	62,50	59,62	51,90	58,67	58,17 abcd
Média	83,95a	86,46a	88,57a	85,20a		57,65a	59,03a	53,31a	54,10a

Figura 9 - Porcentagem de pólen inviável após tratamento com temperatura de 48° C por 24 horas e, coloração ou com carmim acético ou com TTC

4.5 Morfometria Floral

Todas as variáveis analisadas foram significativas ao nível de 5% de probabilidade e suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

O comprimento médio da corola variou de $28,32 \pm 1,60$ a $42,12 \pm 1,47$ mm (Figura 10A), sendo que a maior média foi apresentada pela etnoveriedade DGB 39.0 e a menor pela DGB 26.0. Os valores dos desvios padrão da média foram bastante variados entre as etnoveriedades (0,33 a 3,61). As etnoveriedades DGB 51.0 e a DGB 44.0 foram as que apresentaram os maiores desvios padrão (2,93 e 3,61, respectivamente). Na variável diâmetro da corola, a maior média foi apresentada pela etnoveriedade DGB 55.0 ($42,80 \pm 0,76$ mm) e a menor pela DGB 45.1 ($28,35 \pm 0,7$ mm) (Figura 10B). O desvio padrão para esse caráter variou bastante, com três etnoveriedades apresentando desvios acima de 2 mm (DGB 44.0; DGB 46.0 e DGB 51.0). Os desvios observados para as duas variáveis são relativamente altos, o que revela uma expressiva variabilidade intravarietal. Para o comprimento médio das sépalas, a média variou de $9,31 \pm 0,48$ a $12,42 \pm 0,45$ mm. A etnoveriedade DGB 73.0 apresentou o maior comprimento e a DGB 18.0 o menor. Todas as etnoveriedades, com exceção da 38.0, apresentaram desvio padrão abaixo de ± 1 mm (Figura 10C), indicando que o comprimento das sépalas é praticamente fixo numa etnoveriedade.

Quanto à altura das anteras, foi analisada a altura média das cinco anteras e a altura média da antera mais alta. Em ambas as variáveis, as etnoveriedades que apresentaram as maiores e as menores médias foram as mesmas. A DGB 73.0 apresentou a menor média ($11,42 \pm 1,45$ e $12,76 \pm 1,7$ mm) e a DGB 39.0, a maior ($19,06 \pm 0,71$ e $24,08 \pm 0,79$) para ambas as variáveis, respectivamente (Figuras 10D e E). Observa-se que, na primeira etnoveriedade, em oposição às demais, a variação entre a altura média das cinco anteras e altura média da antera mais alta é reduzida, e que, considerando o desvio padrão, essas médias se sobrepõem.

Para a variável altura do estigma, a média entre as etnoveriedades variou de $18,16 \pm 1,19$ a $23,50 \pm 0,96$ mm, apresentadas pela DGB 73.0 e DGB 39.0, respectivamente (Figura 10F). Essas mesmas etnoveriedades apresentaram as maiores

e menores médias na altura das anteras. Foi determinado o coeficiente de correlação entre a variável altura do estigma e altura da antera mais alta. O coeficiente foi de 0,697, o que significa haver uma correlação positiva entre as variáveis, ou seja, quanto maior a altura média do estigma, maior a altura da antera.

Quanto à posição do estigma em relação à altura da antera mais alta (razão entre altura do estigma e da antera mais alta), as etnovariedades de batata-doce apresentam padrões distintos (Figura 10G); estigma muito mais alto que a antera (Figura 11A), estigma um pouco mais alto que a antera (Figura 11B), estigma no mesmo plano da antera (Figura 11C) e estigma mais baixo que a antera (Figura 11D). As etnovariedades que apresentaram estigma abaixo da antera não se diferenciaram estatisticamente das que apresentaram os dois órgãos no mesmo plano, nem das etnovariedades em que a antera se localiza um pouco abaixo do estigma. Mesmo assim, do ponto de vista da reprodução, existem diferenças marcantes que podem ou não favorecer a autopolinização. A DGB 73.0 apresentou a maior diferença entre o estigma e antera, devido à menor média de altura da antera.

Os resultados aqui descritos demonstram alto polimorfismo morfológico, o que corrobora os trabalhos de Veasey et al. (2007), que trabalharam com etnovariedades do Vale do Ribeira, algumas incluídas no presente estudo. Nesse trabalho os autores sugerem que a variação morfológica pode-se dever ao fato de a espécie ser alógama, devido a eventuais mutações somáticas e pela troca de materiais de cultivo entre os agricultores.

Figura 10 - Variabilidade morfométrica entre 12 etnovariedades de batata-doce. **A e B** – Comprimento e diâmetro da corola. **C** – Comprimento das sépalos. **D** – Alturas médias das cinco anteras de cada etnovarietade. **E** – Altura da antera mais alta. **F** – Altura do estigma e **G** – Posição do estigma em relação à posição da antera mais alta

Figura 11 - Posição do estigma em relação à altura da antera mais alta. **A** – Estigma bem mais alto que a antera (DGB 73.0). **B** – Estigma um pouco mais alto que a antera (DGB 55.0). **C** – Estigma e antera no mesmo plano (DGB 18.0). **D** – Estigma abaixo do plano da antera (DGB 39.0)

Diante da variabilidade demonstrada pelas etnovariedades estudadas através de caracteres florais, realizou-se um teste de divergência genética entre as 12 etnovariedades pela distância euclidiana. De posse da matriz, agruparam-se as etnovariedades pelo método hierárquico UPGMA (Figura 13).

A análise de divergência genética indicou formação de dois grupos principais, subdivididos em grupos secundários. As etnovariedades DGB 44.0 e 46.0 foram as mais similares, seguidas da 38.0 e da 51.0. As etnovariedades reunidas nos dois grupos distintos se cruzam em diversas combinações, gerando frutos (Tabela 2). Várias etnovariedades se cruzam com a variedade comercial adquirida em mercado (DGB 29.0), indicando que elas podem ser incorporadas em programas de melhoramento.

Figura 12 - Dendrograma resultante da análise de 12 etnovariedades de batata-doce (usando os caracteres morfométricos florais), obtido pelo método de agrupamento UPGMA e utilizando a distância Euclidiana como medida de distância genética

5 CONCLUSÕES

Algumas etnovariedades são autocompatíveis apresentando compatibilidade cruzada com todas as outras variedades. O número de alelos presentes na amostra estudada só poderá ser corretamente estimado com dados provenientes das próximas gerações da amostra.

A incompatibilidade tem papel apenas parcial na determinação do insucesso reprodutivo na batata-doce quando autofecundada ou cruzada. Outros mecanismos, provavelmente agindo no óvulo, também interferem no fenômeno. A porcentagem de viabilidade de pólen não parece ter influência sobre o insucesso reprodutivo nos casos estudados.

Há alta variação morfológica entre as etnovariedades, mas essa variação não apresenta nenhuma associação com a incompatibilidade para os genótipos estudados. A variação intra-individual na morfologia do pólen é aparentemente rara na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, T.A.P.; MIRANDA, M.M.B. Contribuição ao conhecimento do gênero *Ipomoea* (Convolvulaceae) através da morfologia do pólen. **Ciência Agrônômica**. Fortaleza, v. 17, n.1, p. 43-48, 1986.

AUSTIN, D.F. The *Ipomoea batatas* complex-I. Taxonomy. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 105, n. 2, p.114-129, 1978.

AUSTIN, D.F. The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species. In: Internal Potato Center. **Exploration, maintenance and utilization of sweet potato genetic resources**, Lima, 1988, p.27-59.

BARTH, O.M.; MELHEM, T.S. **Glossário ilustrado de palinologia**. Campinas: UNICAMP, 1988. 75p

BRUNE, S.; SILVA, J.B; FREITAS, R.A. **Novas técnicas de multiplicação de ramas de batata-doce**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. 08 p. (Circular Técnico 39).

BUENO, L.C.S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. **Melhoramento genético de plantas**. Lavras: UFLA, 2001. 282p.

BUTLER, M.I.; LANBONTE, D.R.; MACCHIAVELLI, R. Determining paternity in polyploids: Hexaploid simulation studies. **Euphytica**, Wageningen, v. 96, n. 3, p. 353-361, 1997.

CRUDEN, R. W.; LLOYD, R. M. Embryophytes have equivalent sexual phenotypes and breeding systems: Why not a common terminology to describe them?. **American Journal of Botany**, New York, v. 82, n. 6, p. 816-825, 1995.

DAFNI, A.; MAUÉS, M.M. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. **Sexual plant reproduction**, Berlin, v.11, n. 3, p. 177-180, 1998.

FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de olericultura. Cultura e comercialização de hortaliças.** São Paulo: Ceres, 1981. 338p.

FOLQUER, F. **La batata (Camote) - Estudio de la planta y su produccion comercial.** San José: Hemisferio sur. 1978. 144p.

GERSTEL, D.U. Self-incompatibility studies in the Guayule. **Genetics**, Austin, v. 35, n. 4, p. 482-506, 1950.

HISCOCK, S.J.; KÜES, U. Cellular and molecular mechanisms of sexual incompatibility in plants and fungi. **International review of cytology**, New York, v. 193, p. 165–295, 1999.

HISCOCK, S.J.; TABAH, D.A. The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B. Biological Sciences**, London, v. 358, n. 1434, p. 1037-1045, 2003.

HUAMAN, Z. **Systematic botany and morphology of the sweetpotato plant.** Lima: International Potato Center, february, 1992. 22p. (Technical Information 25).

HUANG, J.; CORKE, H.; SUN, M. Highly polymorphic AFLP markers as a complementary tool to ITS sequences in assessing genetic diversity and phylogenetic relationships of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its wild relatives. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 49, n. 6, p. 541-550, 2002.

HUGHES, M.B.; BABCOCK, E.B. Self-incompatibility in *Crepis foetida* L. subsp. *rhoeadifolia* Bieb, Schinz et Keller. **Genetics**, Austin, v. 35, n. 5, p. 570-588, 1950.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria>> acesso em: 15 nov. 2007.

JONES, A. Chromosome numbers in *Ipomoea* and related genera. **Journal of Heredity**, Washington, v. 59, n. 2, p.99-102, 1968.

JONES, A. Sweet potato. In: FEHR, W.R.; HADLEY, H.H. **Hybridizations of crop plants**. Madison: American Society of Agronomy: Crop Science Society of America, 1980. Chap. 46, p. 645-566.

KEARNS, C.A.; INOUE, D.W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: Colorado, 1993. 583 p.

KOSHY, K.C.; JEE, G. Studies on the absence of seed set in *Bambusa vulgaris*. **Current Science**, Bangalore, v. 81, n. 4, p. 375-378, 2001.

KOWYAMA, Y.; SHIMANO, N.; KAWASE, T. Genetic analysis of incompatibility in the diploid *Ipomoea* species closely related to the sweet potato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 58, n. 3-4, p. 149-155, 1980.

KOWYAMA, Y.; TAKAHASI, Y.; MURAOKA, K.; TANI, T.; HARA, K.; SHIOTANI, I. Number, frequency & dominance relationships of S-alleles in diploid *Ipomoea trifida*. **Heredity**, London, v. 73, n. 2, p. 275-283, 1994.

LUNDQVIST, A. The nature of the two-loci incompatibility system in grasses. IV. Interaction between the loci in relation to pseudo-compatibility in *Festuca pratensis* Huds. **Hereditas**, Lund, v 52, p.221-234, 1964.

MAGOON, M.L.; KRISHNAN, R.; BAIL, K.V. Cytological evidence on the origin of sweetpotato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 40, n. 8, p. 360-366, 1970.

MARTIN, F.W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology**, Baltimore, v. 34, n. 3, p. 125-128, 1959.

MARTIN, F.W.; CABANILLAS, E. Post-pollen-germination barriers to seed set in sweet-potato. **Euphytica**, Wageningen, v.15, 3, p. 404-411, 1966.

MARTIN, F.W. Sterility in some species related to the sweet potato. **Euphytica**, Wageningen, v.19, n. 4, p. 459-464, 1970.

MARTIN, F.W. Self- and interspecific incompatibility in the Convolvulaceae. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 131, n. 2, p. 139-144, 1970.

MARTIN, F.W.; JONES, A. The species of *Ipomoea* closely related to the sweet potato. **Economic Botany**, New York, v.26, n. 3, p. 201-215, 1972.

MARTIN, F.W.; JONES, A.; RUBERTÉ, R.M. A wild *Ipomoea* species closely related to the sweetpotato. **Economic Botany**, New York, v. 28, n. 3, p.287-292, 1974.

MENDONÇA, A.T.C.; PEIXOTO, N. Efeitos do espaçamento e de níveis de adubação em batata-doce. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 9, n. 2, p. 80-82, 1991.

MURATA, T.; MATSUDA, Y. Histological studies on the relationship between the process from fertilization to embryogenesis and the low seed set of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. **Breeding Science**, Tokyo, v. 53, n. 1, p. 41-49, 2003.

NETTANCOURT, D. **Incompatibility in angiosperms**. Berlin: Springer, 1977. 230 p.

NETTANCOURT, D. **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plant**. 2end. ed. Berlin: Springer, 2000. 322 p.

NISHIYAMA, I. Evolution and domestication of sweetpotato. **Botanical Magazine Tokyo**, Tokyo, v.84, n. 996, p. 377-387, 1971.

ORACION, M.; NIWA, K.; SHIOTANI, I. Cytological analysis of tetraploid hybrids between sweetpotato and diploid *Ipomoea trifida* (H.B.K) Don. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 80, n. 5, p. 617-624, 1990.

PEÑALOZA, A.P.S. **II Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genético Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 89p. (Documento 154).

PUNT, W.; HOEN, P.P.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology**, Amsterdam, v. 143, n. 1-2, p. 1-81, 2007.

RAJAPAKSE, S.; NILMALGODA, S.D.; MOLNAR, M.; BALLARD, R.E.; AUSTIN, D.F.; BOHAC, J.R. Phylogenetic relationships of the sweetpotato in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) based on nuclear β -amylase gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 30, n. 3, p.623-632. 2004.

RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems**. 2end. ed. London: Chapman & Hall, 1997. 529p.

SCHIFINO-WITTMAN, M.T.; AGNOL, M.D. Auto-incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 1083-1090, 2002.

SENGUPTA, S. On the pollen morphology of Convolvulaceae with special reference to taxonomy. **Review of Palaeobotany and Palynology**, Amsterdam, v. 13, n.3-4, p. 157-212, 1972.

SILVA, R.M. **Sistema reprodutiva, fluxo gênico e paternidade em roça de etnovariedades de mandioca (*Maninhot esculenta* Crantz)**. 2000. 131p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

SINHA, S.; SHARMA, S.N. Taxonomic significance of karyomorphology in *Ipomoea* spp. **Cytologia**, Tokyo, v.57, n. 3, p.289-293, 1992.

SRISUWAN, S.; SIHACHAKR, D.; SILJAK-YAKOVLEV, S. The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. **Plant Science**, Oxford, v.171, n. 3, p. 424-233, 2006.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen:** biology, biochemistry, and management. New York: Springer Verlag, 1974. 307 p.

STONE, J.L.; THOMSON, J.D.; DENT-ACOSTA, S.J. Assessment of Pollen Viability in Hand-Pollination Experiments: A Review. **American Journal of Botany**, New York, v. 82, n. 9, p. 1186-1197, 1995.

TECHIO, V.H.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V. Meiosis in elephant Grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*P. glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.2, p. 353-362, 2006.

TELLERÍA, M.C.; DANERS, G. Pollen types in Southern New World Convolvulaceae and their taxonomic significance. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 243, n. 1-2, p. 99-118, 2003.

TERADA, Y.; TANIGUCHI, A.P.; TAKASUSUKI, M.C.C.R.; TOLEDO, V.A.A. Floral biology of four *Ipomoea* (Tubiflorae: Convolvulaceae) species. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.27, n.1, p.137-143, 2005.

TING Y.C.; KEHR, A.E. Meiotic studies in sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 44, n. 5, p. 207-211, 1953.

TOMITA, R.N.; SUZUKI, G.; YOSHIDA, K.; YANO, Y.; TSUCHIYA, T.; KAKEDA, K.; MUKAI, Y.; KOWYAMA, Y. Molecular characterization of a 313-kb genomic region containing the self-incompatibility locus of *Ipomoea trifida*, a diploid relative of sweet potato. **Breeding Science**, Tokyo, v. 54, n. 2, p. 165-175, 2004.

VEASEY, E.A.; SILVA, J.R.Q.; ROSA, M.S.; BORGES, A.; BRESSAN, E.A.; PERONI, N. Phenology and morphological diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) landraces of the Vale do Ribeira. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 416-427, 2007.

VIANNA, R.A.P.; BOBROWSKI, V.L.; SILVA, D.S.; SILVA, S.D.A. Avaliação de diferentes corantes como indicadores de viabilidade do pólen de mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracaju. **Anais Eletrônicos...** Aracaju, 2006. Disponível em: http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/trabalhos_cbm2/033.pdf. Acesso em: 30 nov. 2007.

YEN, D.E. Sweet potato - *Ipomoea batatas* (Convolvaceae). In: SIMMONDS, N.W. **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1976. Chap. 15, p. 42-45.