

# ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS KNOBS CROMOSSÔMICOS EM NÚCLEOS INTERFÁSICOS DE MILHO

**SAMIRA MIGUEL**

ENGENHEIRO-AGRÔNOMO

Departamento de Ciências Biológicas

Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia de JABOTICABAL

Orientador: PROF. DR. ALMIRO BLUMENSCHIN

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de «Magister Scientiae»

**P I R A C I C A B A**

Estado de São Paulo

1972

Aos meus pais

Aos meus mestres

= II =

## AGRADECIMENTOS

Queremos deixar registrado os nossos sinceros agradecimentos para todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho.

## ÍNDICE

	Pág.
LISTA DAS TABELAS .....	V
LISTA DAS FIGURAS .....	VI
LISTA DOS APÊNDICES .....	VIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1. Natureza dos knobs .....	3
2.2. Knobs e as características genéticas .....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	8
3.1. Material .....	8
3.2. Métodos .....	8
3.2.1. Preparo dos embriões .....	8
3.2.2. Preparo das lâminas .....	10
3.2.3. Análise das lâminas .....	10
3.2.4. Métodos estatísticos .....	11
4. RESULTADOS .....	14
5. DISCUSSÃO .....	35
6. RESUMO E CONCLUSÕES .....	41
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS .....	44
8. LITERATURA CITADA .....	47

LISTA DAS TABELAS

	Pág.
1. Coeficientes de correlação linear entre as repetições, calculados com as percentagens dos knobs .....	14
2. Valores de $\chi^2$ para testar o efeito linear da variação da percentagem de knobs .....	26
3. Valores de $\chi^2$ para testar os desvios da regressão representativos da distribuição dos knobs nos tecidos externo e interno .....	27
4. Frequência de knobs por núcleo, independente do tipo morfológico .....	28
5. Frequência (%) de knobs floculados (F), vacuolados (V) e densos (D) observados nos tecidos externos da primeira repetição .....	29
6. Frequência (%) de knobs floculados (F), vacuolados (V) e densos (D) observados nos tecidos externos da segunda repetição .....	30
7. Frequência (%) de knobs floculados (F), vacuolados (V) e densos (D) observados nos tecidos internos da primeira repetição .....	31
8. Frequência (%) de knobs floculados (F), vacuolados (V) e densos (D) observados nos tecidos internos da segunda repetição .....	32
9. Frequência total (%) de knobs floculados (F), vacuolados (V) e densos (D), observados nas duas repetições dos tecidos internos e os valores dos coeficientes de correlação (r) entre estas frequências e o nº total de knobs .....	33
10. Frequência total (%) de knobs floculados (F), vacuolados (V) e densos (D), observados nas duas repetições dos tecidos externos e os valores dos coeficientes de correlação (r) entre estas frequências e o nº total de knobs .....	34

LISTA DAS FIGURAS

	Pág.
1. Núcleo com knobs densos .....	13
2. Núcleo com knobs floculados .....	13
3. Núcleo com knobs vacuolados .....	13
4. Dispersão das frequências totais (%) de knobs floculados nas duas repetições dos tecidos externos .....	15
5. Dispersão das frequências totais (%) de knobs floculados nas duas repetições dos tecidos internos .....	15
6. Dispersão das frequências totais (%) de knobs vacuolados nas duas repetições dos tecidos externos .....	16
7. Dispersão das frequências totais (%) de knobs vacuolados nas duas repetições dos tecidos internos .....	16
8. Dispersão das frequências totais (%) de knobs densos nas duas repetições dos tecidos externos .....	17
9. Dispersão das frequências totais (%) de knobs densos nas duas repetições dos tecidos internos .....	17
10. Histograma das frequências de knobs floculados, nos tecidos externos da primeira repetição .....	19
11. Histograma das frequências de knobs floculados, nos tecidos externos da segunda repetição .....	19
12. Histograma das frequências de knobs floculados, nos tecidos internos da primeira repetição .....	20
13. Histograma das frequências de knobs floculados, nos tecidos internos da segunda repetição .....	20
14. Histograma das frequências de knobs vacuolados, nos tecidos externos da primeira repetição .....	21
15. Histograma das frequências de knobs vacuolados, nos tecidos externos da segunda repetição .....	21

	Pág.
16. Histograma das frequências de knobs vacuolados, nos tecidos internos da primeira repetição .....	22
17. Histograma das frequências de knobs vacuolados, nos tecidos internos da segunda repetição .....	22
18. Histograma das frequências de knobs densos, nos tecidos externos da primeira repetição .....	23
19. Histograma das frequências de knobs densos, nos tecidos externos da segunda repetição .....	23
20. Histograma das frequências de knobs densos, nos tecidos internos da primeira repetição .....	24
21. Histograma das frequências de knobs densos, nos tecidos internos da segunda repetição .....	24

LISTA DOS APÊNDICES

	Pág.
1. Número dos diversos tipos de knobs (F = floculado, V = vacuolado, D = denso) observados nos núcleos dos tecidos externos .....	50
2. Número dos diversos tipos de knobs (F = floculado, V = vacuolado, D = denso) observados nos núcleos dos tecidos internos .....	64
3. Dados referentes a análise do $X^2$ empregada para testar a distribuição dos knobs floculados, vacuolados e densos nos tecidos externos e internos .....	78



## 1. INTRODUÇÃO

Knobs são massas heterocromáticas encontradas nos cromossomos de várias espécies de plantas, principalmente gramíneas. Eles têm sido bastante estudados no milho, na fase do paquinema, podendo aparecer em 22 posições diferentes e específicas, nos 10 cromossomos que formam o complemento haplóide dessa planta.

As regiões, onde se acham os knobs, são curtas e compostas de maneira que cada componente atua independentemente na produção da substância formadora do knob.

O número e o tamanho dos knobs são constantes para uma determinada planta, mas variáveis de planta para planta.

McClintock, Blumenschein e Kato (não publicado), estudando centenas de amostras de milho, provenientes de quase todas as regiões das Américas, verificaram que os knobs podem ser reunidos em conjuntos, que eles chamaram de complexos de knobs. Os knobs de um mesmo complexo originaram-se em uma mesma região geográfica, e seguiram o mesmo modelo de migração. Eles representam germoplasmas específicos. Esses complexos podem caracterizar raças de milho, bem como indicar o grau da relação genética entre essas raças.

Blumenschein (1964 e 1970) mostrou, uma correlação entre os knobs e características morfológicas externas das plantas de milho.

Monteiro (1964) verificou, uma variação no aspecto dos knobs quando estudados na interfase.

Esses trabalhos sugerem uma ligação genética entre knobs e genes responsáveis por características morfológicas, bem como uma possível ação metabólica dos knobs.

Visando colaborar para melhor compreensão desses problemas, desenvolvemos o presente trabalho, com o objetivo específico de verificar se as variações morfológicas dos knobs na interfase seguem algum modelo definido.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Natureza dos knobs

Pouco ainda é conhecido sobre a natureza dos knobs. Eles foram observados pela primeira vez nos cromossomos de milho por McClintock (1929). Ela os observou quando da identificação dos 10 cromossomos dessa planta no paquinema de microsporocitos. Sua utilidade como marcadores citológicos foi muito cedo demonstrada pela mesma autora (1930).

Longley (1937) observou, que algumas plantas de milho não possuem knobs, enquanto outras podem apresentar até o máximo de 18 knobs, que o número e o tamanho deles são constantes em uma mesma planta, mas variáveis de planta para planta. São eles formados por material heterocromático adicional, e que aumentam o comprimento dos cromossomos. Não são exclusivos do milho, tendo sido encontrados também em Antirrhinum, Tripsacum, Euchlaena, Secale e outras plantas. Aparentemente, só em milho e Euchlaena é que eles são intercalares e terminais nos cromossomos. Nas outras espécies eles são apenas terminais.

Painter (não publicado) verificou, que a quantidade de DNA em linhagens de milho contendo knobs era maior que aquela encontrada em linhagens que não continham knobs.

Aguiar (não publicado) verificou, que as regiões heterocromáticas, bem como os knobs, duplicam-se após as outras dos cromossomos.

Monteiro (1964), estudando núcleos interfásicos de milho, corados com Feulgen, observou aspectos diferentes de knobs, classificando-os em densos e vacuolados. O aspecto vacuolado, ele encontrou associado com a inatividade celular (embrião dormente). O aspecto denso, associado com a atividade celular (células meristemáticas). Estudou plantas que continham riqueza de knobs grandes, plantas com ausência de knobs e plantas com knobs grandes e médios. Chegou também a conclusão que havia mudanças na morfologia dos knobs durante o desenvolvimento do embrião.

## 2.2. Knobs e as características genéticas

Longley (1938), estudou um grande número de amostras de milho cultivado pelos índios norte-americanos, e sugeriu que a constituição em knobs podia dar informações sobre a origem geográfica de linhagens de milho. Foi Longley o primeiro pesquisador a utilizar os knobs para caracterização de raças de milho.

Vachhani (1950), em estudo sobre 20 linhas autofecundadas de milho, de procedências diversas, não encontrou relação alguma

entre o número de knobs cromossômicos e diversos caracteres vegetativos, inclusive rendimento. O autor reconheceu que utilizou pequena amplitude de variação quanto ao número de knobs e as posições formadoras deles.

Welhausen, Roberts e Hernandez (1952), usaram knobs para caracterização de raças de milho do México. Encontraram os números de knobs mais baixos nas raças mais antigas do México, e também que toda raça presumivelmente de origem híbrida tinha número de knobs maior do que qualquer um dos prováveis pais. Após esse trabalho apareceram outros autores usando os knobs como características raciais.

Blumenschein (1964), cruzou plantas da raça Zapalote Chico que possui 10 knobs, com plantas do milho Knobless Flint, que, como o nome diz não possui knobs. Na geração  $F_2$ , ele estudou a associação de 15 características morfológicas quantitativas claramente distintas, dos dois milhos envolvidos no cruzamento, com a presença de knobs. Das 150 associações possíveis, ele encontrou significância estatística em 48 delas.

No mesmo trabalho, o autor observou diferenças significativas entre plantas com knobs heterozigotos e a média das plantas homozigotas, com e sem knobs. Considerou tal ocorrência como indicação de que a condição dos knobs pode refletir a condição dos genes a eles ligados.

Blumenschein (1965), em estudo sobre knobs e sua aplicação no melhoramento do milho, concluiu que os knobs de alguma maneira estão sujeitos a pressão de seleção, e que o efeito da seleção sobre

os mesmos pode ser explicado pela ligação genética desses knobs com genes responsáveis por características morfológicas externas que estão sujeitas diretamente a seleção. O autor considerou que a utilização dos dados citológicos poderão auxiliar como métodos de melhoramento do milho.

Kato e Blumenschein (1967), estudaram citologicamente coleções de milho de diferentes regiões da América, constatando que determinado knob caracterizado pela posição e tamanho, teve seu centro de origem na região que apresentou uma maior concentração de suas frequências. Descreveram os complexos de knobs, seus centros, suas interrelações e as possíveis rotas de migração. O germoplasma característico da raça Zapalote Chico predomina no extremo sul do México, tendo influenciado os milhos de algumas regiões ao longo da costa Oeste do México e regiões baixas do Sul da Guatemala, sendo que o modelo da distribuição desse germoplasma é bastante característico. Seu centro de origem se localiza na região Sudoeste do México, especificamente no Estado de Oaxaca.

As diferentes condições de knobs, nas frequências homozigotas e heterozigotas dos mesmos, foram estudadas por Blumenschein (1968), pela ação da seleção para produção. Seleção para alta produção aumentou a frequência dos knobs heterozigotos na análise de diversas populações de milho. A frequência da ausência de knobs parece não ter sido afetada pela seleção para baixa produção.

Possibilidade da utilização prática das informações de parentesco fornecidas pelos knobs, assim como a necessidade e

importância do desenvolvimento de estudos sobre a correlação entre esses graus de parentesco e heterose, foram estudados por Vencovsky e Blumenschein (1969). Heterose para produtividade foi observada em 9 híbridos interraciais e parâmetros de heterose calculados a partir de frequências de knobs. Concluíram os autores que, a relação entre heterose observada e a diversidade das populações (frequência de knobs), não é linear.

Estudos sobre knobs cromossômicos e a resistência para Heliothis zea, em cruzamentos de milho, foram estudados por Wanjari e Widstrom (1970). Foram observadas as frequências e as posições dos knobs nos 10 cromossomos meióticos, em 24 linhagens endogâmicas e 13 cruzamentos homozigotos, envolvendo estudos de resistência. Nenhuma relação foi encontrada entre a resistência e número de knobs nas linhagens testadas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

Foram utilizadas sementes de milho da raça Zapalote Chico, cujo número de estoque é 1032, correspondente ao plantio 1966/67, do Instituto de Genética da ESALQ. Zapalote Chico é uma raça cujo centro principal é o Sudoeste do México.

Foi escolhida essa raça porque a sua citologia é bem conhecida, sabendo-se que a amostra estudada possui knobs homozigotos em 11 posições dos seus cromossomos. Usamos somente sementes grandes e uniformes.

#### 3.2. Métodos

##### 3.2.1. Preparo dos embriões

Inicialmente o embrião foi separado do endosperma em cada semente. Isto foi feito para facilitar o trabalho posterior de preparação das lâminas. Para isto foi usado um bisturi que permitia a separação sem que o embrião fosse afetado. Em um trabalho paralelo onde a metodologia exigia absorção de material radioativo, e onde se



procurou economizar ao máximo a solução marcada, verificou-se que os embriões deixados nas sementes, e aqueles separados das sementes, mas colocados em contato com uma solução nutritiva, não diferiam quanto ao aspecto dos núcleos.

Os embriões selecionados foram colocados em placas de Petri, sobre papel chupão embebido com uma solução nutritiva.

A solução nutritiva usada foi:

Substância	Quantidade
$\text{Ca} (\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	20 cc
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	20 cc
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	20 cc
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	20 cc
$\text{Fe} (\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,025 g
$\text{Mn SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	0,075 g
Sacarose .....	20,0 g
Água destilada .....	Até completar 1 litro

Os embriões foram deixados em papel chupão durante os seguintes períodos de tempo e depois fixados: 0,0 hora; 0,5 hora; 1,0 hora; 1,5 hora; 2,0 horas; 2,5 h.; 3,0 h.; 3,5 h.; 4,0 h.; 4,5 h.; 5,0 h.; 5,5 h.; 6,0 h.; 6,5 h.; 7,0 h.; 7,5 h.; 8,0 h.; 8,5 h.; 9,0h.; 9,5 h.; 10,0 h.; 10,5 h.; 11,0h.; 11,5h.; 12,0h.; 24,0h. Decorrido o tempo correspondente a cada permanência, os embriões foram retirados e fixados durante 12 a 24 horas, à temperatura ambiente em uma mistura de três partes de álcool absoluto e uma parte de ácido acético glacial. Após

a fixação, o material foi transferido para álcool 70% e guardado no refrigerador, a uma temperatura de + 10°C, até o momento de ser manipulado.

### 3.2.2. Preparo das lâminas

Foram preparadas lâminas permanentes através do processo de inclusão em parafina, segundo Johansen (1940). A espessura dos cortes foi de 12 micra. Os cortes foram feitos no sentido longitudinal de cada embrião. A coloração foi feita pelo método de Feulgen. A hidrólise em HCl N/10 foi feita a uma temperatura de 60°C durante 10 minutos. O tempo de coloração foi de 3 horas. A montagem das lâminas foi feita em bálsamo do Canadá.

### 3.2.3. Análise das lâminas

Foram feitos cortes de 2 embriões completos, que estavam em contato com a solução nutritiva, para cada período de tempo (2 repetições). Os cortes consecutivos de cada embrião foram colocados em uma mesma lâmina. Assim para cada tempo foram obtidas 2 lâminas, cada uma contendo os cortes de um único embrião. Em cada lâmina foi escolhido apenas um corte, aquele onde as camadas de tecidos pudessem ser reconhecidas mais facilmente. Em cada corte foram escolhidos, na radícula, 10 núcleos, nas camadas parenquimatosas mais externas, logo abaixo da epiderme; outros 10 núcleos nas camadas de células parenquimatosas mais internas, próximas à região formadora dos tecidos condutores. Os núcleos escolhidos pertenciam a células vizinhas.

Nos núcleos verificou-se o aspecto dos knobs. Se eram fortemente coloridos (densos), veja fig. 1. Se com intensidade variável de coloração (floculados), veja fig. 2. Ou com região limitada, fortemente colorida, e uma porção pouco corada (vacuolados), veja fig. 3.

Foi determinado o número de knobs dos tipos acima descritos, em cada núcleo.

#### 3.2.4. Métodos estatísticos

a) Uma vez que foram utilizados dois embriões em cada período de tempo, a procura foi a de verificar se as variações percentuais dos diversos tipos morfológicos de knobs eram correlacionados entre essas repetições. Calculou-se para isso o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) entre os dados obtidos dos dois embriões de cada período de tempo, em cada tecido e para cada tipo de knob. A fórmula usada foi a usual para o cálculo do coeficiente de correlação (Snedecor, 1957).

b) A fim de verificar se as percentagens de cada tipo de knob apresentaram uma variação suficiente no decorrer do presente trabalho, para análise comparativa dos diversos períodos de tempo, foram feitos cálculos dos valores de qui-quadrado, usando as percentagens de cada tipo morfológico de knob para cada posição, nos tecidos interno e externo da radícula, e, para cada repetição. Para o cálculo dos valores de qui-quadrado, foi usada a seguinte expressão:

$$\chi^2 = \frac{100 (\bar{p}_i X_i - \bar{p} \Sigma X_i)}{\bar{p} (100 - \bar{p})}$$

Sendo  $p_i$  a percentagem de um dado tipo de knob, no tempo  $i$ , e  $X_i$  o número destes knobs nesse tempo. O valor  $\bar{p}$  é a percentagem média do referido tipo de knob.

c) Para verificar se a percentagem de cada tipo morfológico de knob mostrou uma variação linear com o tempo, o valor do qui-quadrado obtido da fórmula descrita em b, foi desdobrado de maneira a obter um componente para medir o efeito linear e outro para medir os desvios das regressões das percentagens em relação a esses períodos. A expressão usada para a obtenção do qui-quadrado relativo ao efeito linear foi segundo Steel e Torrie (1960).

$$\chi^2 = \frac{[\Sigma X_i Z_i - X (\Sigma n_i Z_i/n)]^2}{[\Sigma n_i Z_i^2 - (\Sigma n_i Z_i)^2/n] (\bar{p})(1-\bar{p})}$$

Sendo  $X_i$  o número de knobs de um dado tipo observado no tempo  $i$ ;  $Z_i$  o número de horas correspondente ao tempo  $i$ ;  $X$  o total de número de knobs do dado tipo;  $n_i$  o número total dos três tipos de knobs no tempo  $i$ ;  $n$  o total geral dos três tipos de knobs e  $\bar{p}$  a proporção média do dado tipo de knob.

d) Para calcular a correlação entre o número total de knobs contados nos diferentes períodos e a percentagem de cada tipo morfológico, foi usada a expressão usual para o coeficiente de correlação linear.

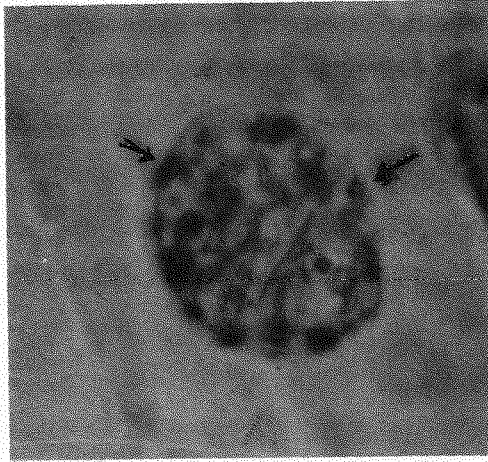


Figura 1. Núcleo com knobs  
densos

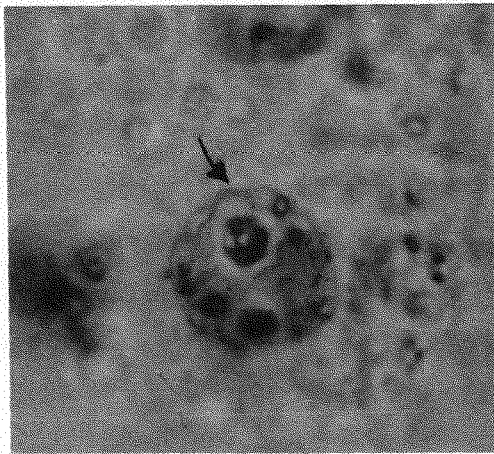


Figura 2. Núcleo com knobs  
floculados

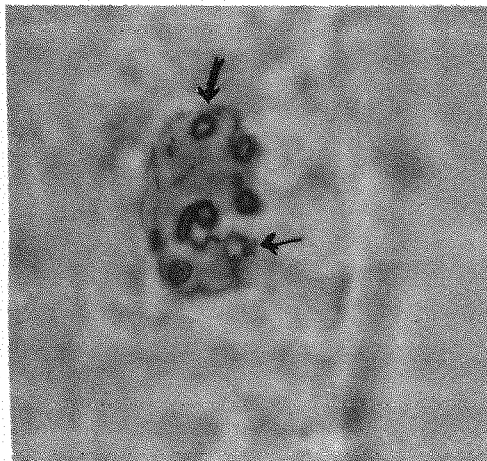


Figura 3. Núcleo com knobs  
vacuolados

—  
10 μ

## 4. RESULTADOS

Nas tabelas dos Apêndices I e II, estão dispostas as frequências dos knobs nos tecidos externo e interno, com os diferentes aspectos (floculado, vacuolado e denso), em cada núcleo e para cada período do embrião em desenvolvimento.

Com base nos dados dos Apêndices foram organizadas as tabelas 5,6,7 e 8, que mostram as frequências totais (%) dos diferentes tipos de knobs observados nos diversos núcleos, em cada período proposto.

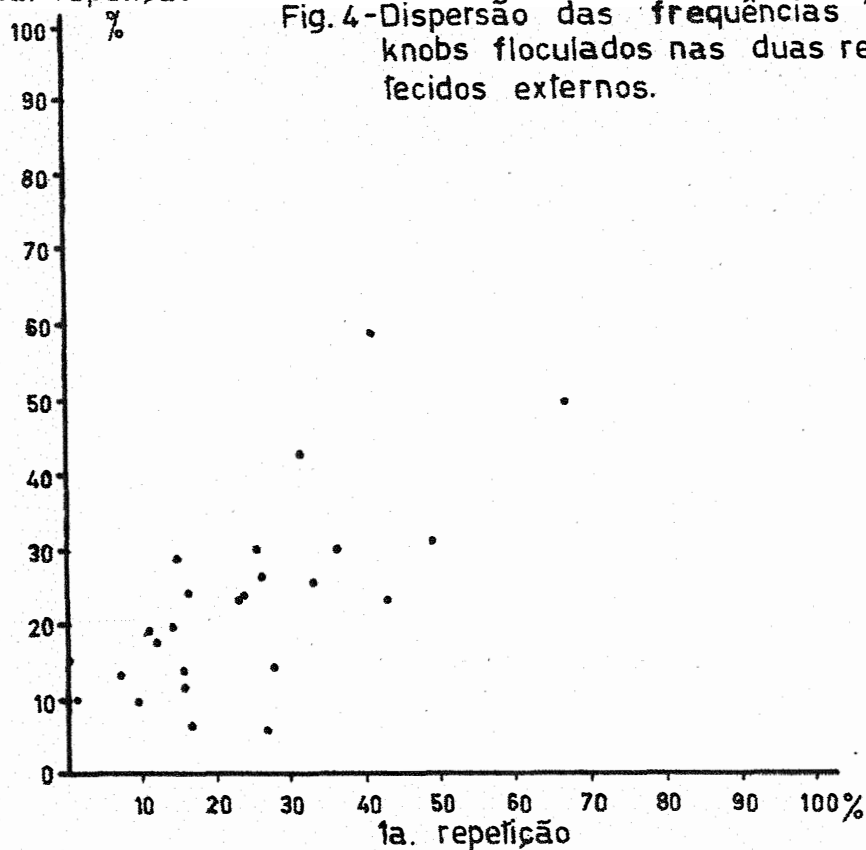
Observa-se nessas tabelas que as variações percentuais entre as repetições apresentam flutuações. Essas flutuações são concordes conforme evidenciam os coeficientes de correlação (entre repetições). Estes variaram de 0,6059 a 0,8430 e foram todos altamente significativos ao nível de 1%, conforme a tabela 1.

Tabela 1. Coeficientes de correlação linear entre as repetições, calculados com as percentagens dos knobs.

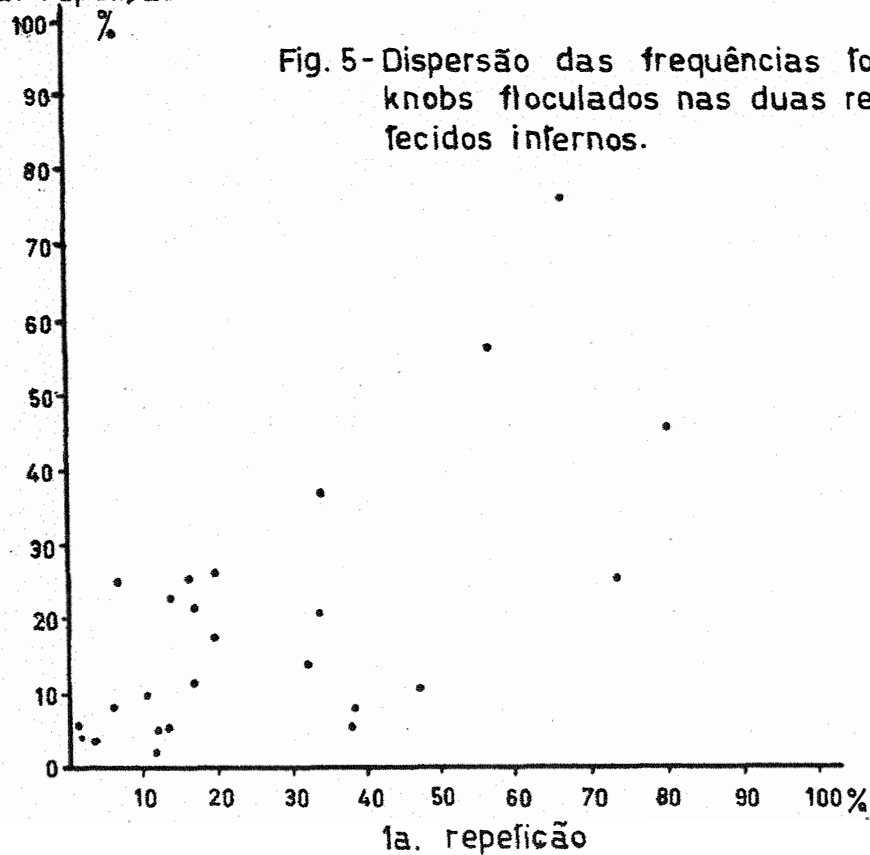
Tecido	Tipo de knob		
	Floculado	Vacuolado	Denso
Interno	0,6856***	0,7459***	0,6059**
Externo	0,7037***	0,7499***	0,8430***

As figuras de número 4 a 9 ilustram a dispersão das frequências e as correlações observadas.

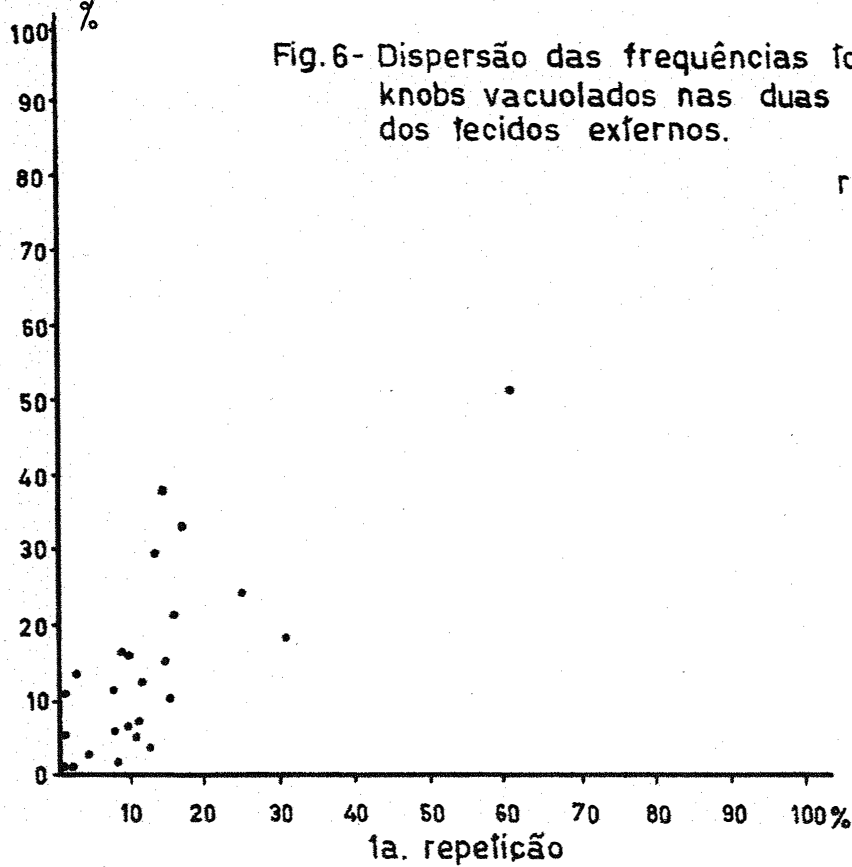
2a. repetição



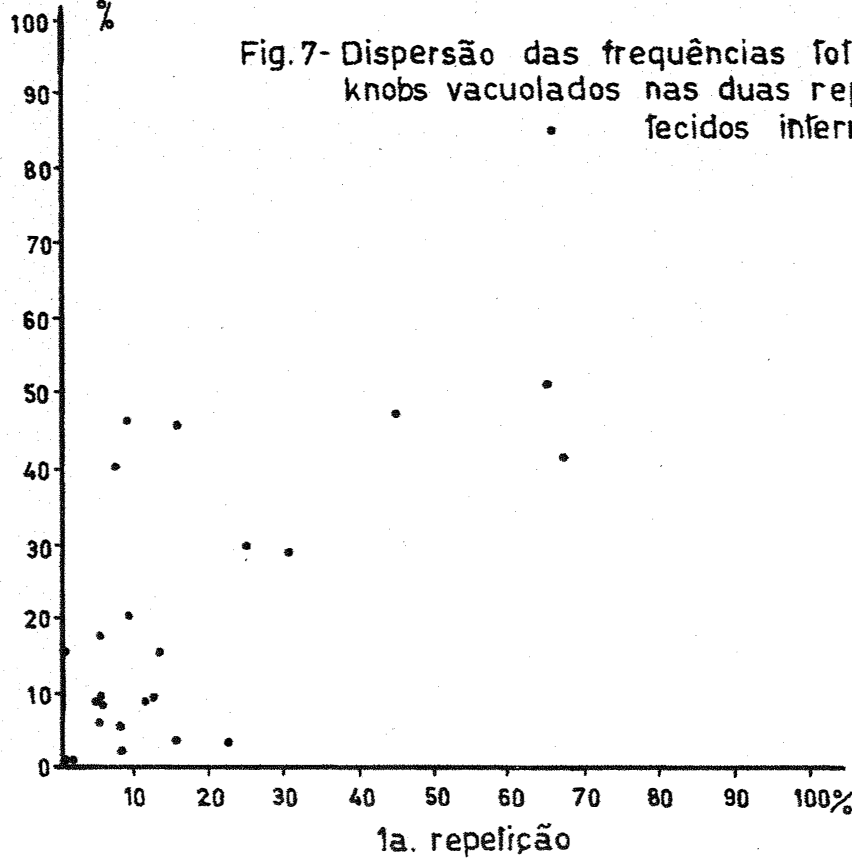
2a. repetição



2a. repetição

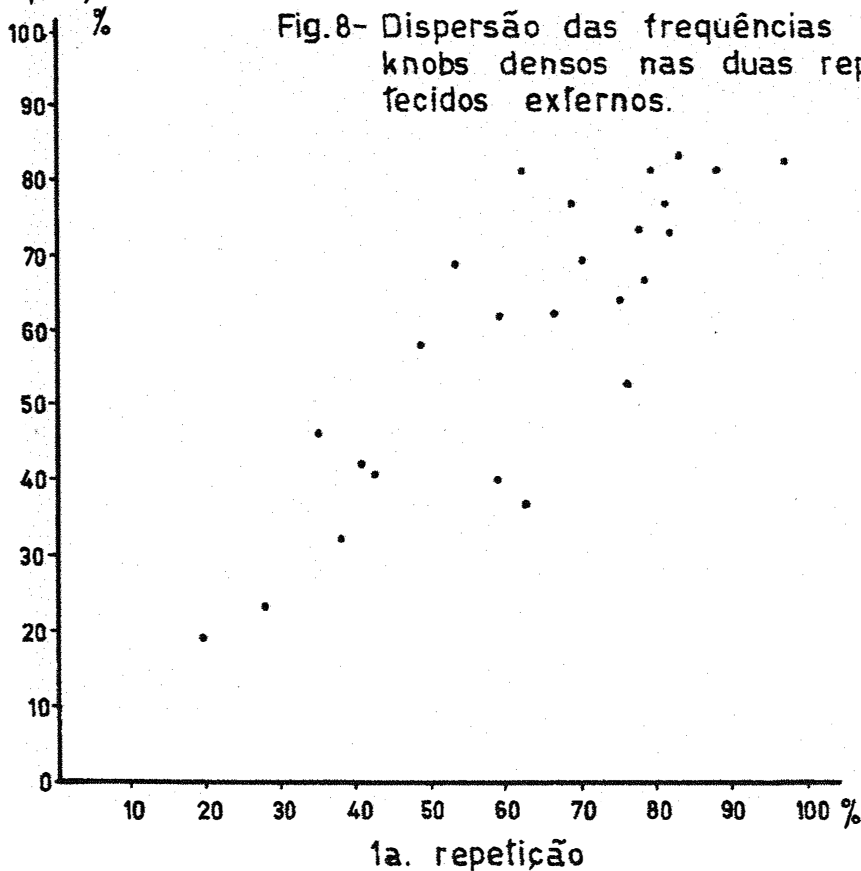


2a. repetição

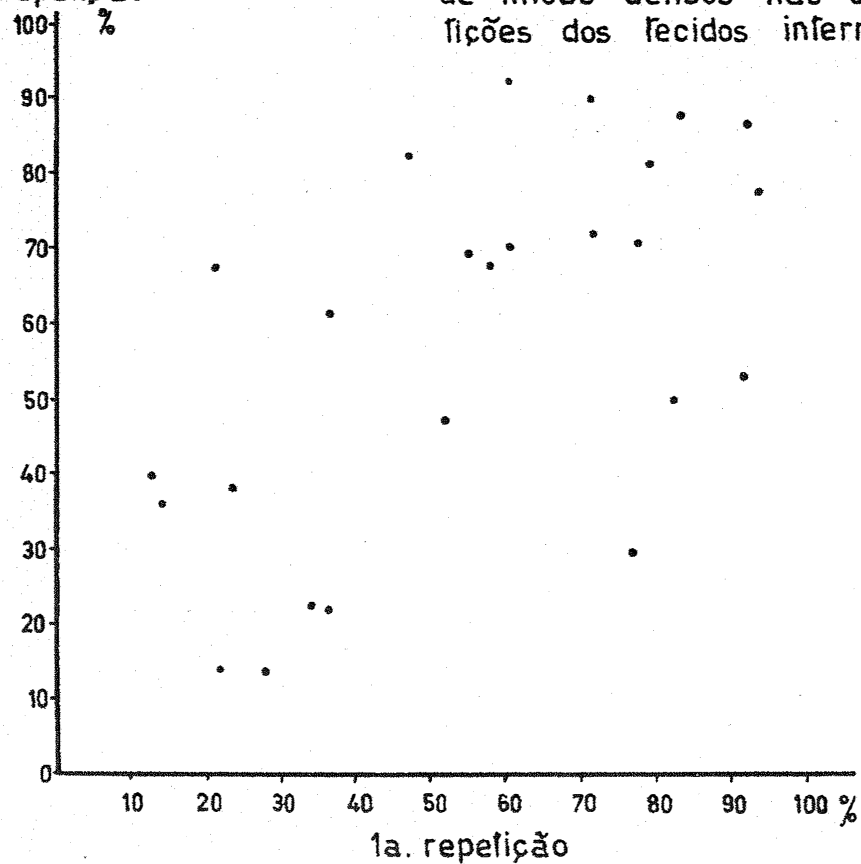




2a. repetição



2a. repetição



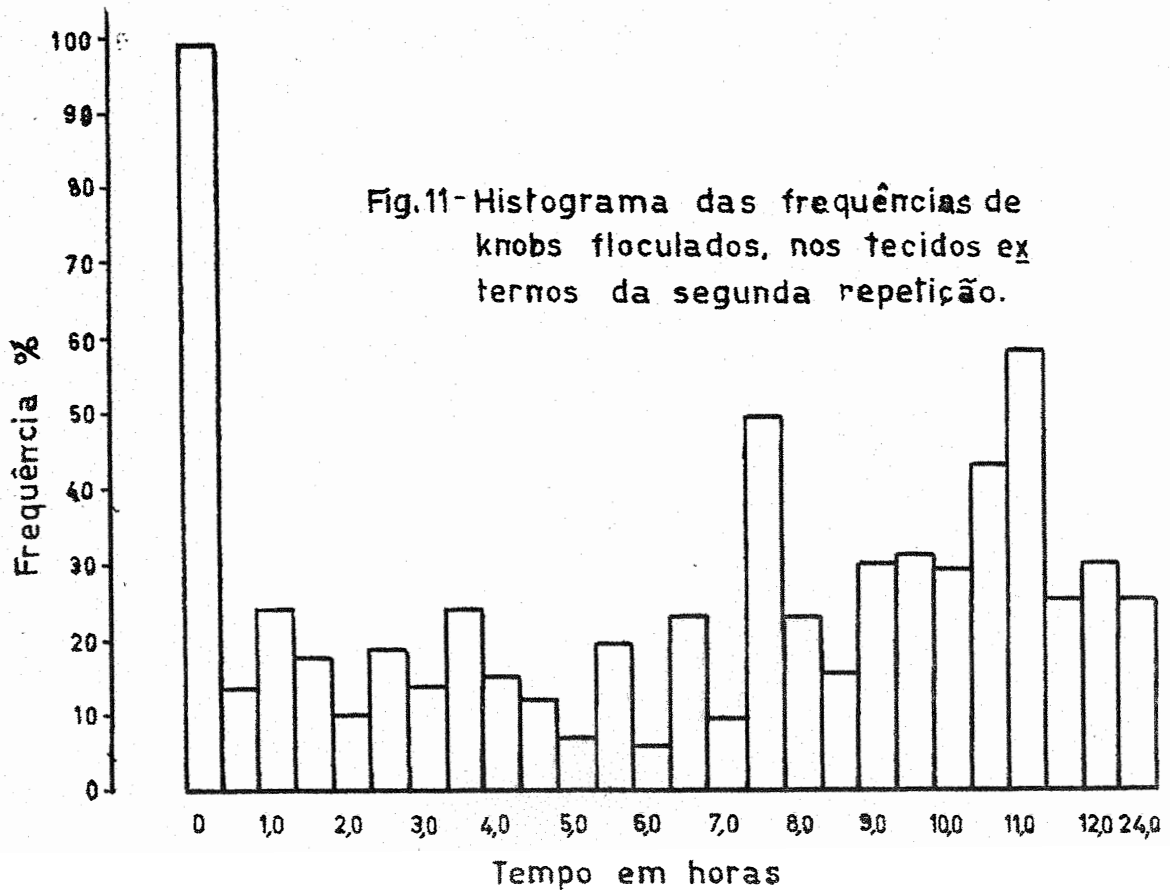
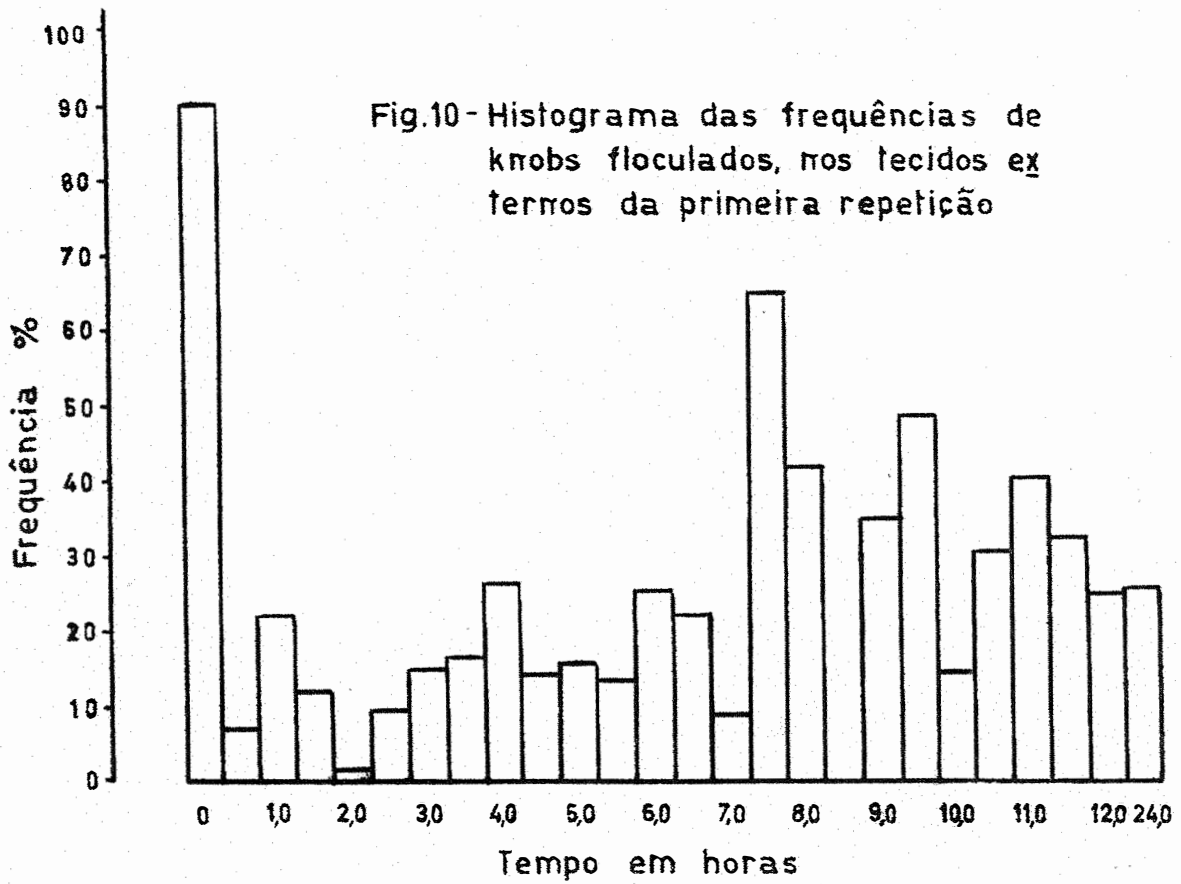
Nas figuras 10 a 21 estão representadas as frequências encontradas dos diferentes tipos de knobs. Essas figuras foram feitas com base nos dados das tabelas 5 a 8.

Na fase de dormência do embrião, antes do contato com a solução nutritiva (0 hora), a totalidade dos knobs observados nos tecidos internos mostrou o aspecto floculado. Nos tecidos externos a quase totalidade (95,28%) dos knobs mostrou-se floculado. Após a primeira meia hora na solução, a grande maioria dos knobs (mais de 79%) mostrou aspecto denso. Houve portanto, uma mudança relativamente rápida no aspecto dos mesmos.

Analisadas as frequências dos knobs com aspecto denso em tecidos externos, nos intervalos propostos, notou-se decréscimo dessa frequência nos períodos mais longos. Essa diminuição, porém, não mostrou uma sequência uniforme. Ao redor das 7,5 horas houve uma diminuição mais intensa, a seguir uma ligeira elevação, nova diminuição intensa ao redor das 11 horas e depois uma nova elevação nos últimos períodos.

Com relação às frequências dos knobs vacuolados nos tecidos externos, observou-se uma tendência de aumento a partir das 4 horas, alcançando um máximo ao redor das 8 horas e diminuindo gradativamente a partir desse tempo.

As frequências dos knobs floculados nos tecidos externos mostraram-se relativamente baixas nas primeiras horas, diminuindo um pouco mais entre 6,5 e 7 horas, aumentando depois das 7,5 horas, mantendo-se um pouco mais elevadas até as 11 horas, quando passaram a diminuir.



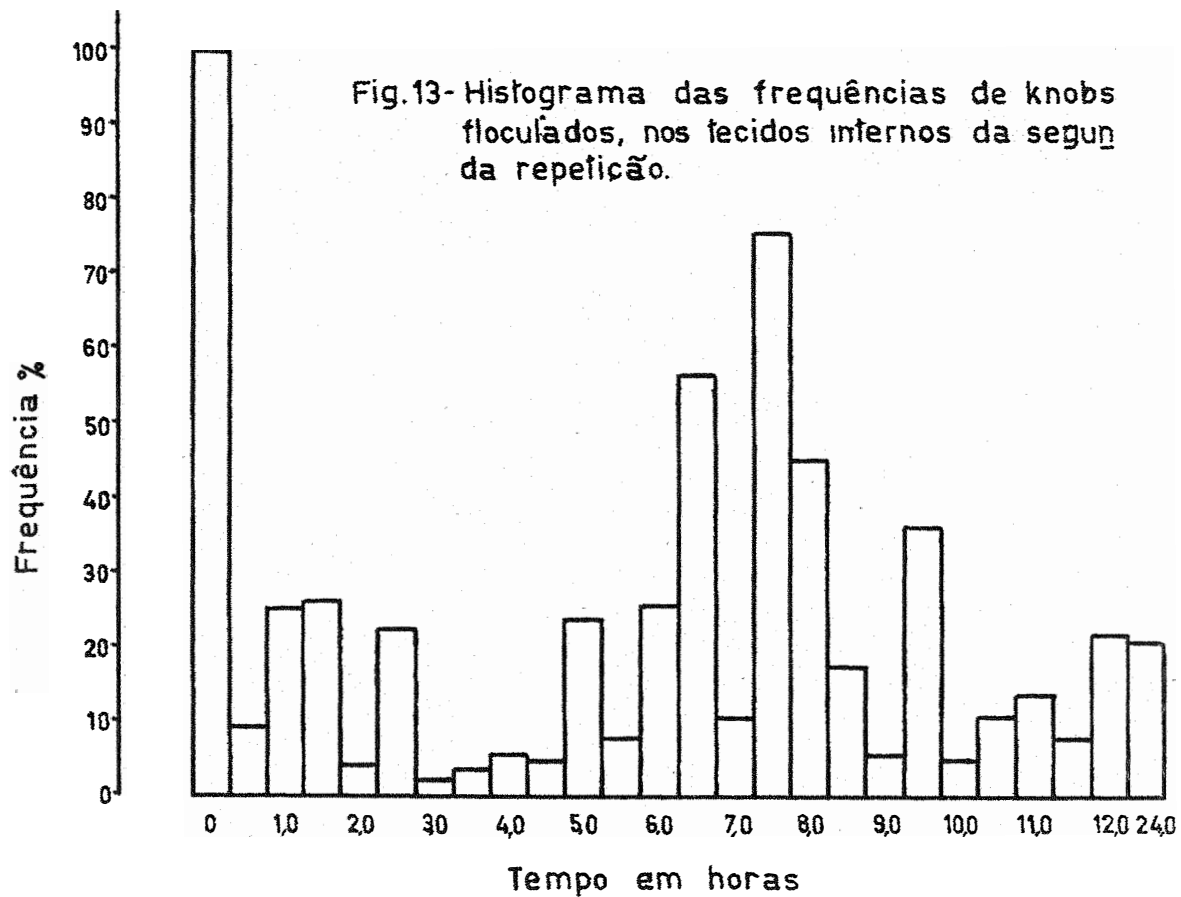
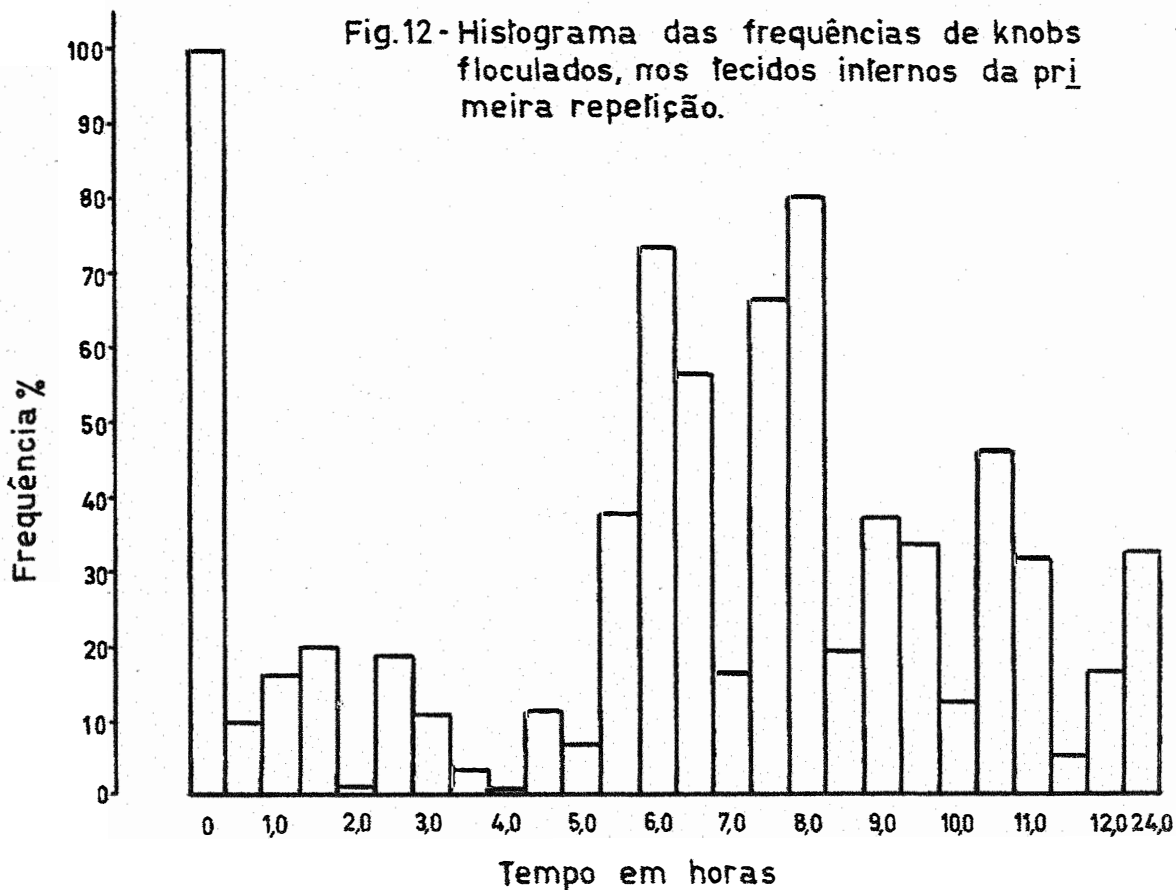


Fig.14- Histograma das frequências de knobs vacuolados, nos tecidos externos da primeira repetição.

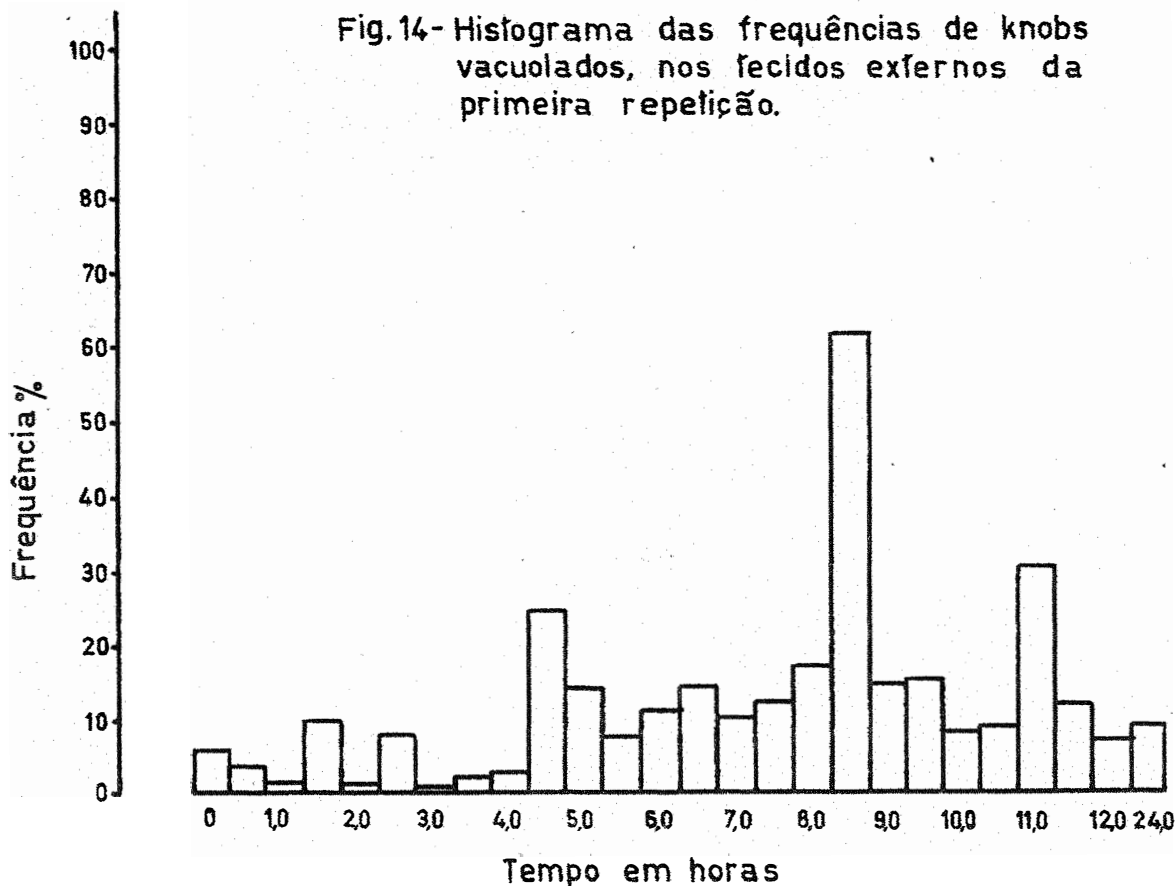


Fig.15- Histograma das frequências de knobs vacuolados, nos tecidos externos da segunda repetição.

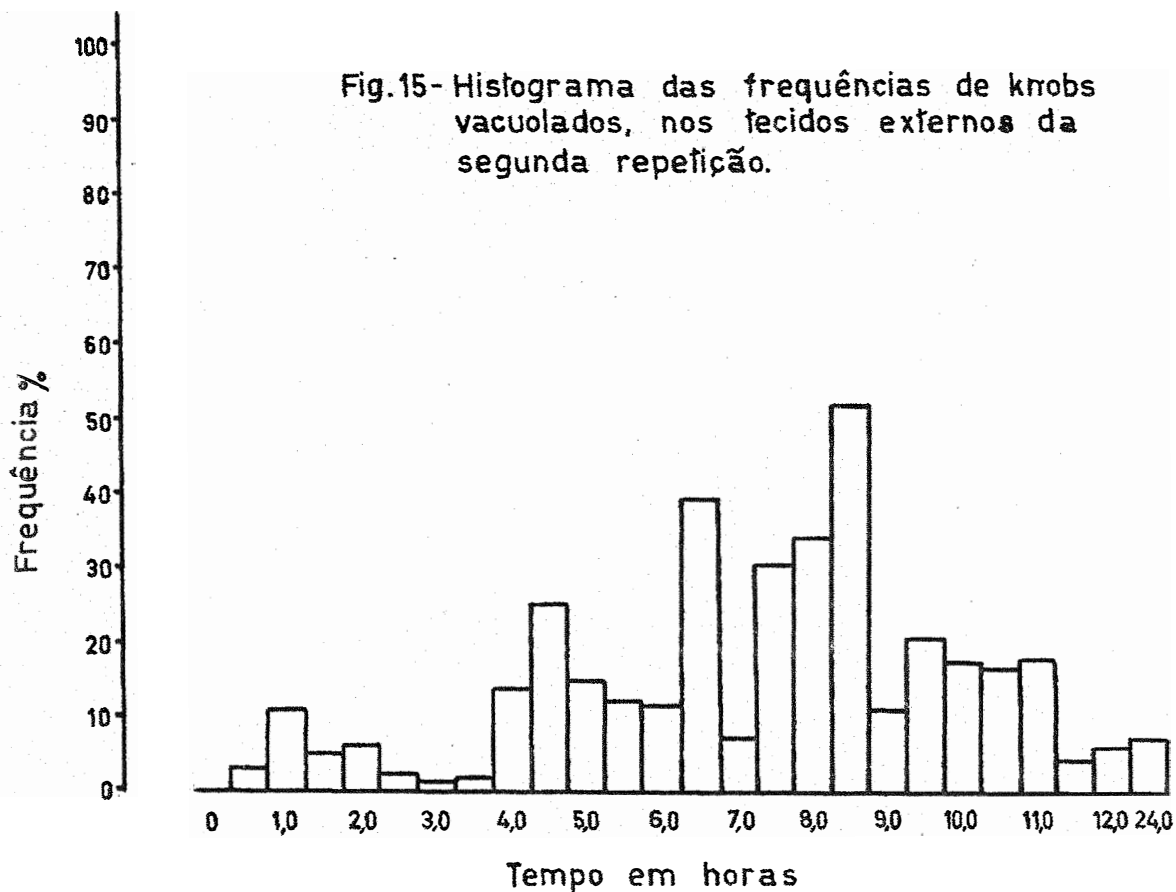


Fig. 16 - Histograma das frequências dos knobs vacuolados, nos tecidos internos da primeira repetição.

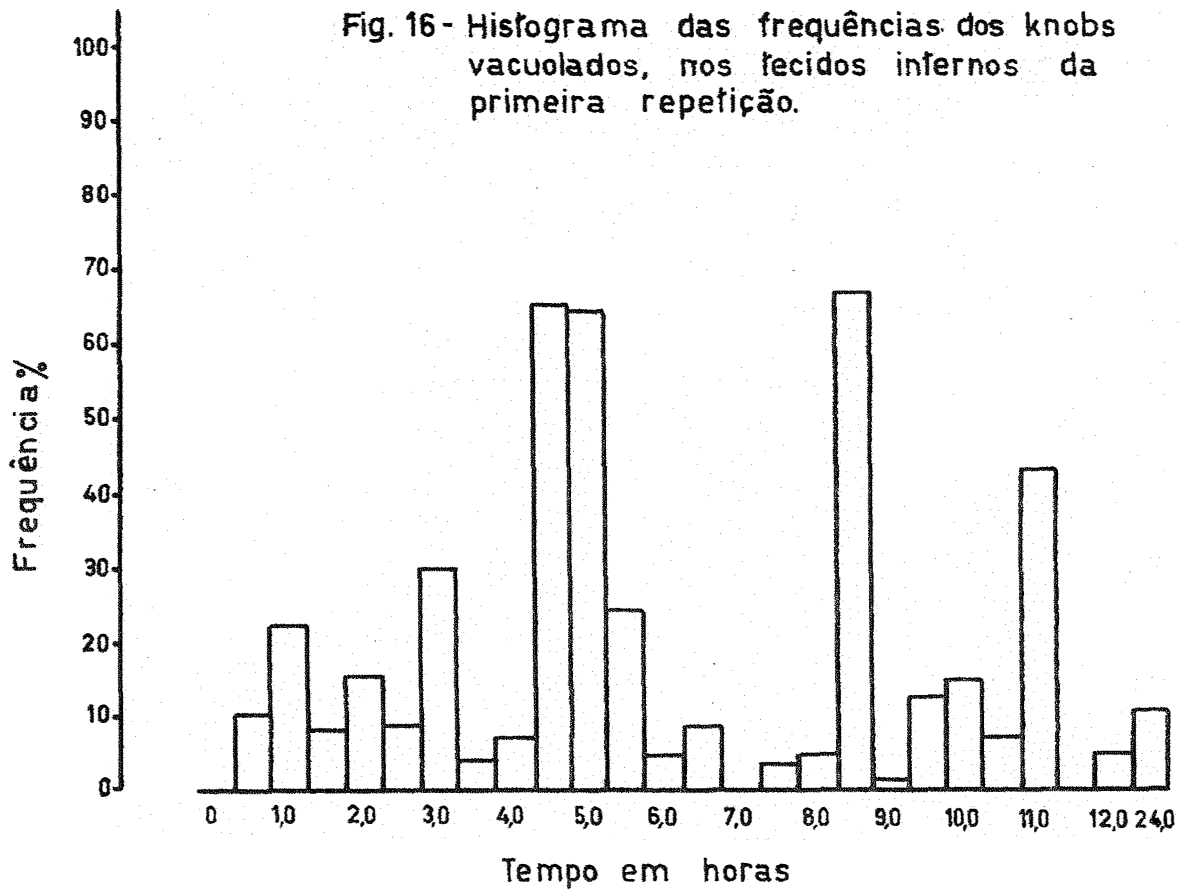


Fig. 17 - Histograma das frequências de knobs vacuolados, nos tecidos internos da segunda repetição.

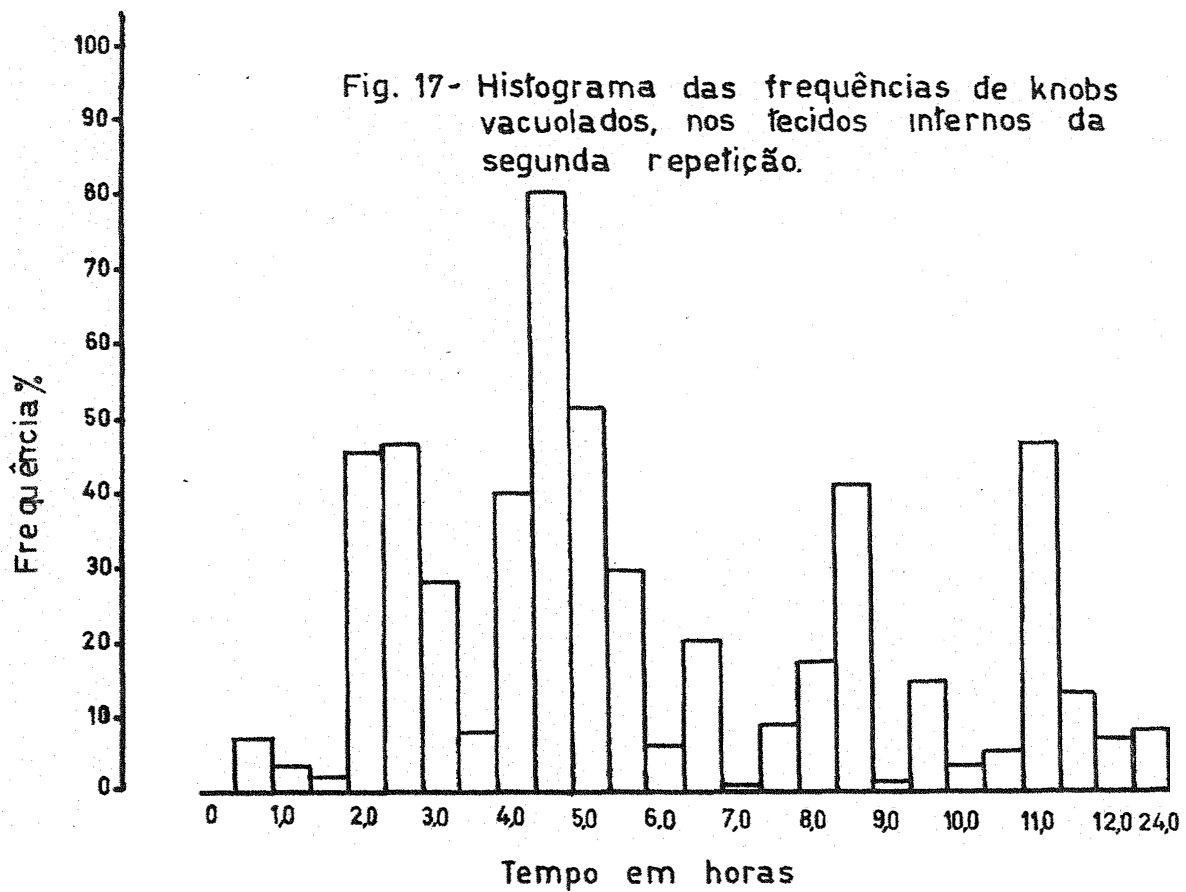


Fig.18- Histograma das frequências de knobs densos, nos tecidos externos da primeira repetição.

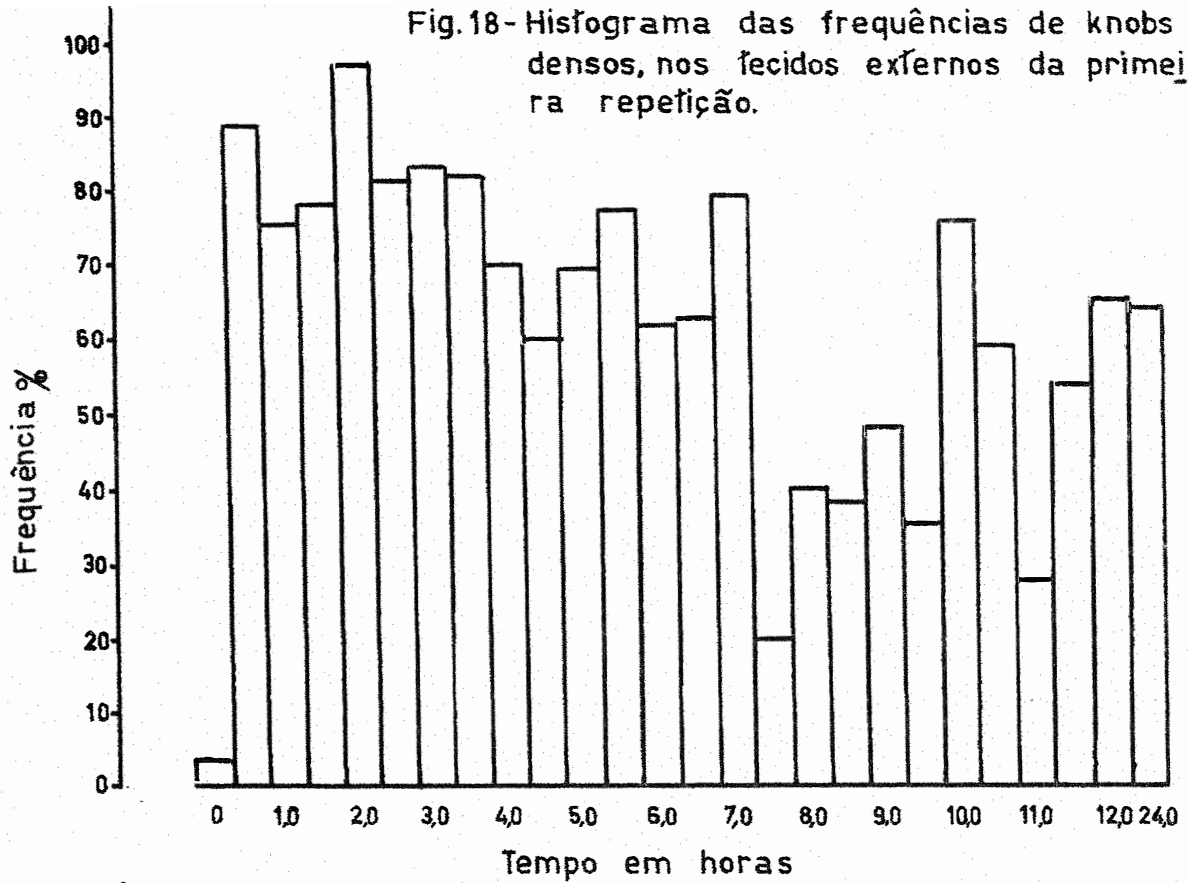


Fig.19- Histograma das frequências de knobs densos, nos tecidos externos da segunda repetição.

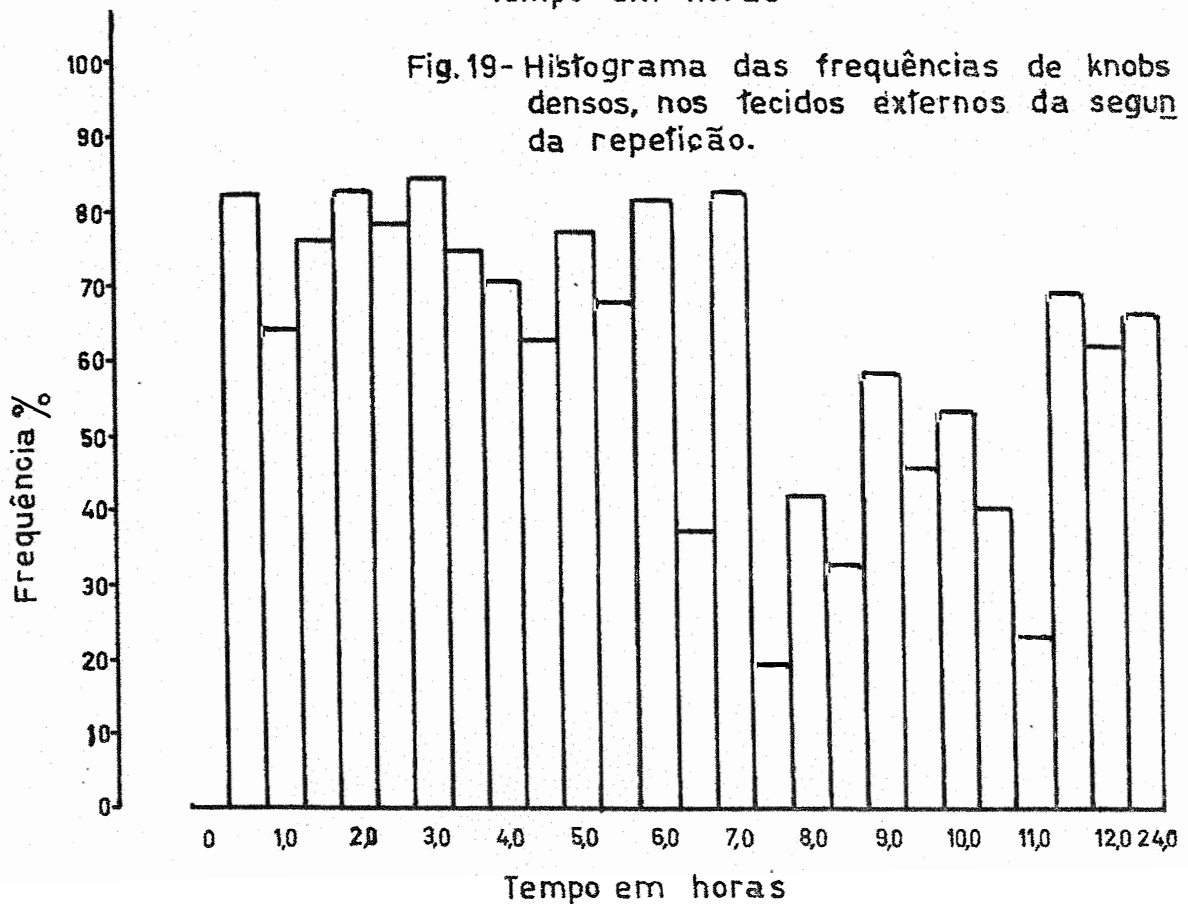


Fig. 20 - Histograma das frequências de knobs densos, nos fecidos infernos da primeira repetição.

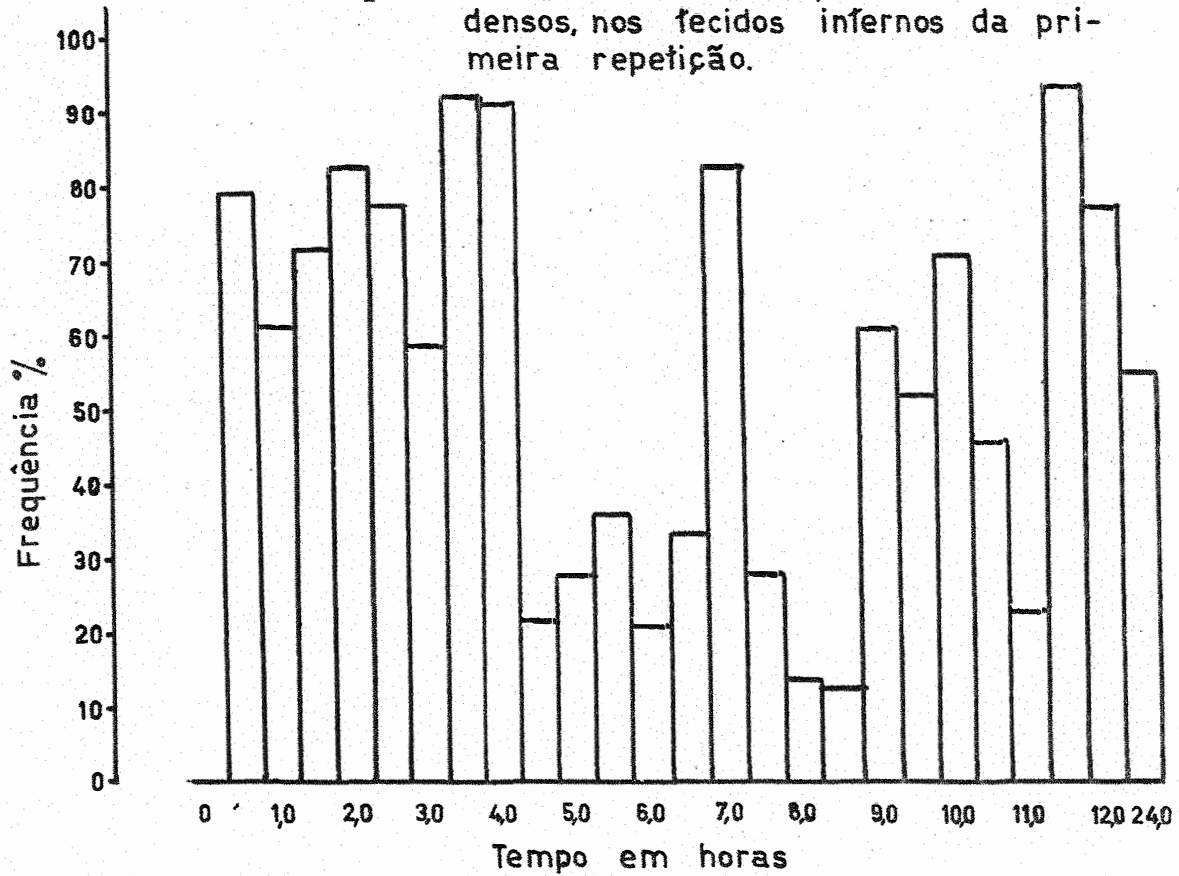
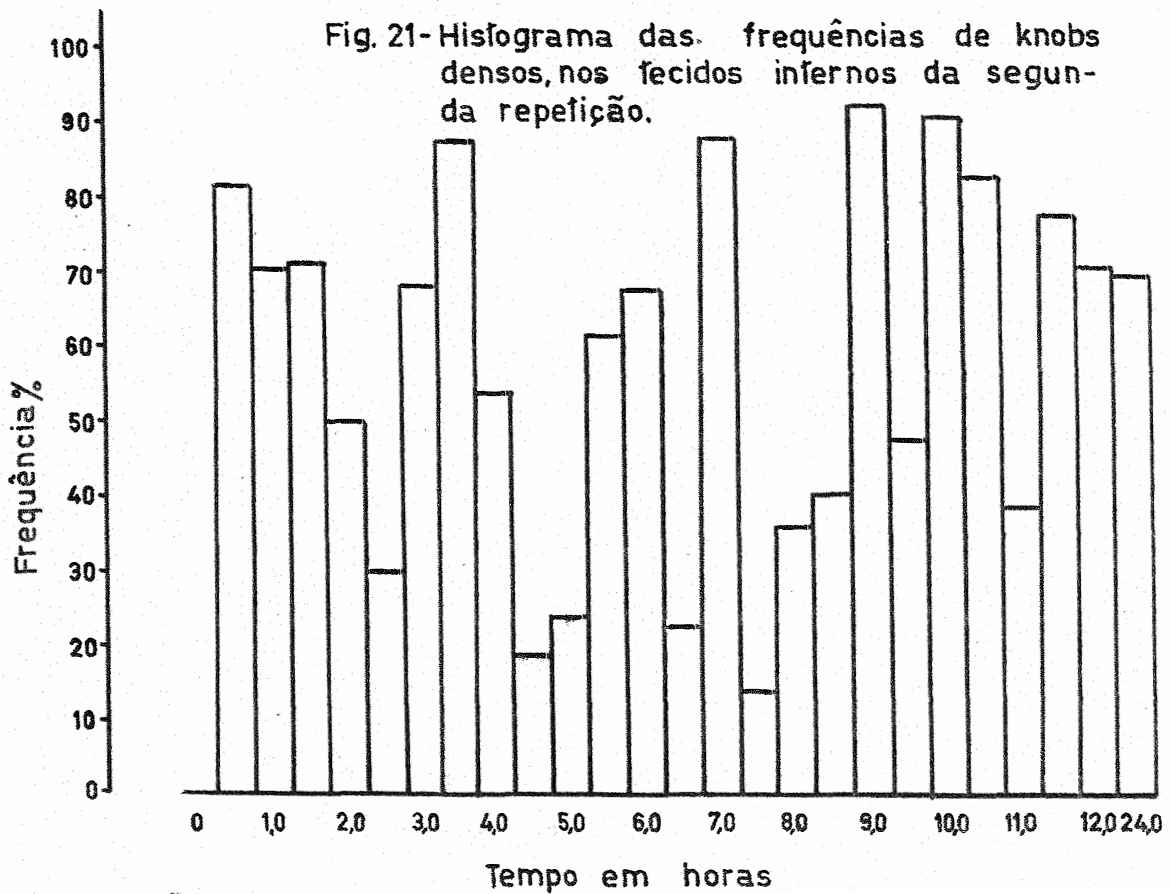


Fig. 21 - Histograma das frequências de knobs densos, nos fecidos infernos da segunda repetição.





Nos tecidos internos a situação não foi a mesma. A frequência dos knobs densos na primeira repetição não mostrou tendência padronizável muito clara; na segunda repetição houve uma leve tendência de diminuição das frequências nos períodos mais avançados. Todavia, entre 4 e 5 horas; 7,5, 8,5 e 11 horas, observou-se diminuições mais intensas com aumento de frequências logo a seguir.

As frequências dos knobs vacuolados nos tecidos internos mantiveram-se relativamente baixas, elevando-se nitidamente ao redor das 4 e 5 horas; 8,5 e 11 horas.

As frequências dos knobs floculados nos mesmos tecidos foram relativamente baixas nos primeiros períodos, quase alcançando o zero ao redor de 3 e 4 horas, depois aumentando de frequência, alcançando valores máximos entre 6 e 8 horas, passando a diminuir de novo gradativamente até as 12 horas.

Portanto, aparentemente existe uma certa variação cíclica na frequência dos três tipos morfológicos de knobs. As frequências mínimas e máximas dos três tipos, se alternam dando a impressão de que os tipos densos e floculados são extremos, e os vacuolados, intermediários na transformação.

É importante considerar, porém, que a frequência dos knobs densos foi, no total, maior do que os outros tipos.

Os valores de qui-quadrado, para testar o efeito linear da variação de percentagem dos diversos aspectos de knobs, foram altamente significativos, como pode ser observado na tabela 2 e Apêndice III,

com excessão dos valores para knobs densos, nos tecidos internos da segunda repetição e para knobs vacuolados nos tecidos internos da primeira repetição,

Tabela 2. Valores de  $X^2$  para testar o efeito linear da variação da percentagem de knobs.

Knobs \ Tecido	Externo		Interno	
	1ª Repet.	2ª Repet.	1ª Repet.	2ª Repet.
Floculado	80,71 ***	64,42 ***	59,39 ***	4,51 *
Vacuolado	63,30 ***	47,60 ***	0,39 n.s.	6,43 *
Denso	176,52 ***	141,47 ***	37,92 ***	0,16 n.s.

As tendências são semelhantes nos tecidos externo e interno, porém elas são mais conspícuas nos tecidos externos, do que nos tecidos internos.

Apesar da tendência geral das frequências dos diferentes tipos de knobs aumentarem ou diminuírem com o tempo de permanência do embrião na solução, as frequências apresentaram flutuações que seguem um modelo definido, isto é, passível de definição.

Estas flutuações são estatisticamente significativas, como pode ser observado na tabela 3 e Apêndice III, que contém os valores do qui-quadrado para desvios da regressão.

Tabela 3. Valores de  $X^2$  para testar os desvios da regressão representativos da distribuição dos knobs nos tecidos externo e interno.

Knobs \ Tecido	Externo		Interno	
	1ª Repet.	2ª Repet.	1ª Repet.	2ª Repet.
Floculado	229,03 <sup>***</sup>	138,46 <sup>***</sup>	409,31 <sup>***</sup>	353,60 <sup>***</sup>
Vacuolado	253,60 <sup>***</sup>	240,57 <sup>***</sup>	480,68 <sup>***</sup>	466,35 <sup>***</sup>
Denso	218,70 <sup>***</sup>	225,61 <sup>***</sup>	479,10 <sup>***</sup>	462,10 <sup>***</sup>

Nº de G.L. = 22

Nas tabelas 9 e 10 estão reunidas as frequências dos tipos de knobs observados nas duas repetições dos tecidos interno e externo, bem como o número total de knobs analisados no tempo correspondente.

Observa-se nessas tabelas que o número de knobs analisados é maior nas primeiras horas, diminuindo após. A regressão entre número de knobs e período de permanência do embrião naquela solução, é negativa, e estatisticamente significativa ( $b = - 5,04^{**}$ ,  $b = - 9,27^{***}$ ).

A contagem do número de knobs realizada em 24 horas de permanência dos embriões na solução nutritiva, demonstrou equivalência, ou pequena diferença, àquelas realizadas em 12 horas.

Pelas figuras 2 e 3, nota-se que quando o número de knobs por núcleo foi pequeno, o tamanho dos mesmos foi maior.

Pela tabela 4, verifica-se que o número de knobs analisados por núcleo variou de 4 a 20, nos tecidos externos, e, de 4 a 15,

nos internos. A maioria dos núcleos nos tecidos externos analisados apresentou de 8 a 10 knobs, enquanto que nos tecidos internos de 6 a 8.

Tabela 4. Frequência de knobs por núcleo, independente do tipo morfológico.

Nº de knobs p/ Núcleo	Frequência dos knobs nos núcleos	
	Tecido Externo	Tecido Interno
4	3	13
5	6	33
6	28	73
7	57	114
8	81	100
9	70	53
10	85	35
11	48	21
12	48	21
13	20	9
14	18	3
15	7	1
16	5	0
17	0	0
18	1	0
19	2	0
20	1	0
21	0	0
22	0	0
Total	480	476

Tabela 5. Frequência (%) de knobs floculados (F), vacuolados (V) e densos (D) observados nos tecidos externos da primeira repetição.

Tratamentos (horas)	Tipos de knobs			Nº de knobs
	F	V	D	
0	90,91	6,06	3,03	66
0,5	7,50	4,17	88,33	120
1,0	23,63	0,92	75,45	110
1,5	11,96	10,25	77,79	117
2,0	1,79	0,89	97,32	112
2,5	10,71	8,04	81,25	112
3,0	16,03	0,76	83,21	131
3,5	16,36	1,81	81,82	110
4,0	27,66	2,13	70,21	94
4,5	15,22	25,00	59,78	92
5,0	16,67	14,58	68,75	96
5,5	14,29	7,69	78,02	91
6,0	26,44	11,49	62,07	87
6,5	22,86	14,28	62,86	105
7,0	9,82	10,72	79,46	112
7,5	66,35	13,46	20,19	104
8,0	42,86	16,88	40,26	77
8,5	0,0	61,73	38,27	81
9,0	36,11	15,28	48,61	72
9,5	49,30	15,49	35,21	71
10,0	15,00	8,75	76,25	80
10,5	31,32	9,64	59,04	83
11,0	41,03	30,77	28,20	78
11,5	33,33	12,50	54,17	72
12,0	25,64	7,69	66,67	78
24,0	26,19	9,52	64,29	84

Tabela 6. Frequência (%) de knobs floculados (F), vacuolados (V) e densos (D) observados nos tecidos externos da segunda repetição.

Tratamentos (horas)	Tipos de knobs			Nº de knobs
	F	V	D	
0	100,00	0,00	0,00	61
0,5	13,92	3,80	82,28	158
1,0	24,49	11,22	64,29	98
1,5	18,09	5,71	76,20	105
2,0	10,43	6,09	83,48	115
2,5	19,33	2,52	78,15	119
3,0	14,29	1,50	84,21	133
3,5	24,62	1,50	73,88	134
4,0	15,39	14,29	70,32	91
4,5	12,12	25,25	62,63	99
5,0	7,48	14,95	77,57	107
5,5	20,00	12,38	67,62	105
6,0	6,14	12,28	81,58	114
6,5	23,53	38,82	37,65	85
7,0	9,89	7,69	82,42	91
7,5	50,00	30,68	19,32	88
8,0	23,69	34,21	42,10	76
8,5	15,58	51,95	32,47	77
9,0	30,16	11,11	58,73	63
9,5	31,51	21,91	46,58	73
10,0	29,27	17,07	53,66	82
10,5	43,04	16,46	40,50	79
11,0	58,90	17,81	23,29	73
11,5	25,84	4,50	69,66	89
12,0	30,67	6,67	62,66	75
24,0	26,74	6,97	66,29	86

Tabela 7. Frequência (%) de knobs floculados (F), vacuolados (V) e densos (D) observados nos tecidos internos da primeira repetição.

Tratamentos (horas)	Tipos de knobs			Nº de knobs
	F	V	D	
0	100,00	0,00	0,00	69
0,5	10,43	10,44	79,13	115
1,0	16,37	22,45	61,22	98
1,5	20,17	8,40	71,43	119
2,0	1,15	16,09	82,76	87
2,5	14,10	8,98	76,92	78
3,0	11,54	30,77	57,69	78
3,5	3,57	4,45	91,96	112
4,0	1,24	7,40	91,36	81
4,5	11,94	65,67	22,39	67
5,0	7,04	64,79	28,17	71
5,5	38,33	25,00	36,67	60
6,0	73,21	5,36	21,43	56
6,5	56,60	9,44	33,96	53
7,0	16,67	0,00	83,33	78
7,5	66,67	5,00	28,33	60
8,0	80,00	5,71	14,29	70
8,5	19,67	67,21	13,12	61
9,0	37,10	1,61	61,29	62
9,5	34,33	13,43	52,24	67
10,0	12,99	15,58	71,43	77
10,5	46,27	7,46	46,27	67
11,0	31,94	44,45	23,61	72
11,5	6,33	0,00	93,67	79
12,0	16,90	5,63	77,47	71
24,0	33,33	11,60	55,07	69

Tabela 8. Frequência (%) de knobs floculados (F), vacuolados (V) e den-  
dos (D) observados nos tecidos internos da segunda repetição.

Tratamentos (horas)	Tipos de knobs			Nº de knobs
	F	V	D	
0	100,00	0,00	0,00	94
0,5	10,00	8,18	81,82	110
1,0	25,74	3,96	70,30	101
1,5	26,42	2,83	70,75	106
2,0	4,05	45,95	50,00	74
2,5	22,97	47,30	29,73	74
3,0	2,90	28,99	68,11	69
3,5	3,96	8,91	87,13	101
4,0	5,95	40,48	53,57	84
4,5	5,55	80,56	13,89	72
5,0	24,00	52,00	24,00	75
5,5	8,22	30,14	61,64	73
6,0	25,81	6,45	67,74	93
6,5	56,45	20,97	22,58	62
7,0	11,24	1,12	87,64	89
7,5	76,06	9,86	14,08	71
8,0	45,46	18,18	36,36	66
8,5	17,74	41,94	40,32	62
9,0	5,97	1,49	92,54	67
9,5	36,84	15,79	47,37	76
10,0	5,41	4,05	90,54	74
10,5	11,11	6,17	82,72	81
11,0	14,29	47,14	38,57	70
11,5	8,33	13,89	77,78	72
12,0	21,18	8,23	70,59	85
24,0	21,21	9,09	69,70	66



Tabela 9. Frequência total (%) de knobs flocculados (F), vacuolados (V) e densos (D), observados nas duas repetições dos tecidos internos e os valores dos coeficientes de correlação (r) entre estas frequências e o nº total de knobs.

Tratamentos (horas)	Tipos de knobs			Nº de knobs
	F	V	D	
0	100,00	0,00	0,00	163
0,5	10,22	9,33	80,45	225
1,0	21,10	13,07	65,83	199
1,5	23,11	5,78	71,11	225
2,0	2,49	29,81	67,70	161
2,5	18,42	27,63	53,95	152
3,0	7,48	29,93	62,58	147
3,5	3,76	6,57	89,67	213
4,0	3,64	24,24	72,12	165
4,5	8,63	73,38	17,99	139
5,0	15,75	58,22	26,03	146
5,5	21,80	27,82	50,38	133
6,0	43,62	6,04	50,34	149
6,5	58,03	16,07	25,90	112
7,0	13,77	0,60	85,63	167
7,5	71,76	7,63	20,61	131
8,0	63,24	11,76	25,00	136
8,5	18,70	54,47	26,83	123
9,0	20,93	1,55	77,52	129
9,5	35,66	14,69	49,65	143
10,0	9,27	9,93	80,80	151
10,5	27,03	6,76	66,22	148
11,0	23,24	45,77	30,99	142
11,5	7,29	6,62	86,09	151
12,0	19,23	7,05	73,72	156
24,0	27,41	10,37	62,22	135
Valor de r	-0,4159*	-0,3261n.s.	0,6042**	b = -5,04**

Tabela 10. Frequência total (%) de knobs flocoados (F), vacuolados (V) e densos (D), observados nas duas repetições dos tecidos externos e os valores dos coeficientes de correlação (r) entre estas frequências e o nº total de knobs.

Tratamentos (horas)	Tipos de knobs			Nº de knobs
	F	V	D	
0	95,28	3,14	1,57	127
0,5	11,15	3,95	84,90	278
1,0	24,04	5,77	70,20	208
1,5	14,87	8,10	77,03	222
2,0	6,17	3,52	90,30	227
2,5	15,15	5,20	79,65	231
3,0	15,15	1,14	83,71	264
3,5	20,90	1,64	77,46	244
4,0	21,62	8,11	70,27	185
4,5	13,61	25,13	61,26	191
5,0	11,82	14,78	73,40	203
5,5	17,35	10,20	72,45	196
6,0	14,93	11,94	73,13	201
6,5	23,16	25,26	51,58	190
7,0	9,85	9,36	80,79	203
7,5	58,85	21,35	19,80	192
8,0	33,33	25,50	41,17	153
8,5	7,60	56,96	35,44	158
9,0	33,33	13,33	53,34	135
9,5	40,28	18,75	40,97	144
10,0	22,22	12,96	64,82	162
10,5	37,04	12,96	50,00	162
11,0	49,67	24,50	25,83	151
11,5	29,19	8,08	62,73	161
12,0	28,10	7,19	64,71	153
24,0	26,47	8,24	65,29	170
Valor de r	-0,5383**	-0,5258*	0,7041***	b = -9,27***

## 5. DISCUSSÃO

Para facilitar o trabalho posterior de preparação de lâminas, ao invés de fazer uso de sementes integrais, foram colocados apenas os embriões em contato com a solução.

Em trabalho preliminar foi observada certa semelhança na variação do aspecto dos núcleos em embriões de sementes integrais, ou eles isolados. Essas observações, porém, não tiveram o controle necessário para afirmação de que o desenvolvimento das mudanças será o mesmo nos diversos períodos. De qualquer maneira, a substituição do endosperma pela solução nutritiva não impediu a sequência de mudanças no aspecto dos knobs. Ainda assim fica a possibilidade das mudanças serem diferentes, caso seja conservado o endosperma.

Nos resultados verificou-se que, na fase de dormência, isto é, a zero hora de permanência, a totalidade dos knobs tinha aspecto floculado e, somente meia hora de contato com a solução, os knobs mudaram, na sua grande maioria, para o aspecto denso. As condições do trabalho não permitiram verificar se essa mudança é de natureza fisiológica ou se, está relacionada com uma eventual atividade metabólica dos knobs. Realmente este trabalho não visa e nem prova essa

atividade metabólica, mas tão somente a variação morfológica dos knobs. Todavia é interessante ressaltar os trabalhos que vêm sendo desenvolvidos em Sciarídeos, com relação ao efeito de hormônios na formação de puff. Esses trabalhos mostram que certos hormônios são aparentemente controladores do processo de desenvolvimento dos puffs. Por outro lado foi estudado por Perondini (1968), a sequência de formação e de regressão de puffs de DNA, mostrando que alguns deles acumulam DNA metabólico desde o início de sua formação, enquanto outros acumulam DNA metabólico só durante a síntese de RNA, e que, a quantidade de DNA metabólico sintetizado nos puffs varia de puff para puff. Seria possível imaginar que no milho, em condições para desenvolvimento do embrião poderá haver liberação rápida de substâncias que poderão atuar no aspecto dos knobs, mudando-os de flocculados para densos.

Seria interessante um estudo mais intenso nos tempos correspondentes a zero e meia hora, testando o efeito de substâncias presentes no embrião.

Analisando-se os embriões, em períodos mais longos, verificou-se que há uma aparente variação cíclica nas frequências dos diversos tipos de knobs.

É possível que a atividade metabólica dos knobs, decorrente dos diversos períodos com a solução nutritiva, dê como consequência modificações em sua morfologia. A mudança morfológica só é constatada com a coloração de Feulgen, sendo que outro corante como o carmin não mostra essa variação. Aparentemente há uma ligação com mudanças metabólicas ou estruturais dos ácidos nucleicos, pois o Feulgen é

específico para o DNA. Essas variações podem estar relacionadas com mecanismos responsáveis pela germinação da semente e desenvolvimento do embrião.

É verdade que a variação cíclica dos knobs não é muito bem definida, porém isso seria de se esperar em estudo dessa natureza. É desconhecido se os mesmos variam de morfologia sincronicamente. Pode ocorrer, e isto parece ser provável, pequenas variações quanto ao tempo, pois cada knob muda de aspecto de maneira a mostrar a variação observada. Sendo clara a tendência geral de sincronização. Seria interessante e decisivo um estudo de cada knob isoladamente. Isto porém só pode ser feito em linhagem especialmente desenvolvida e que contenha um único knob.

É interessante a observação, de que além da tendência de formar ciclos de variação, também existe uma diminuição gradativa da frequência total de knobs densos e, um aumento na frequência total de floculados à medida que aumenta os períodos analisados.

Nos períodos mais longos do desenvolvimento dos embriões, o aspecto denso dos knobs, ou a atividade metabólica refletida por este aspecto, torna-se menos frequente ou menos importante, enquanto que a atividade refletida pelo aspecto floculado torna-se mais importante.

O vacuolado é realmente um aspecto intermediário. Argumento feito em função de suas frequências que são sempre intermediárias, quando comparadas com as frequências dos knobs floculados e densos.

Os resultados deste trabalho acham-se bem próximos aos relatados por Monteiro (1964), que, trabalhou com sementes e inflorescências de três linhagens de milho, N.C.45, K.Y.S. e Knobless Flint. Esse autor quando utilizou sementes, analisou endosperma, aleuroma e pericarpo, tendo adotado um intervalo amplo de 6 horas entre suas análises. Quanto ao aspecto dos knobs, a sua classificação não foi somente em três categorias, como o presente trabalho, mas, o autor utilizou uma classificação de "tipos" entre os não densos, baseando-se no arranjo cromático apresentado pelo núcleo. As suas conclusões finais aproximam-se destas, com relação a morfologia dos knobs densos e não densos quando comparadas com o estágio de evolução do embrião, isto é, período de dormência da semente e período de desenvolvimento do embrião.

Os presentes dados com relação ao período de 24 horas mostram grande semelhança com as frequências observadas nas 12 horas, o que pode significar que, o período cíclico esteja compreendido nas 12 horas, dando então, uma repetição nesse intervalo de tempo, ou então que após 12 horas as frequências estacionariam. Caso isso seja válido, a tendência da diminuição da frequência dos knobs densos ocorreu nas primeiras 12 horas e aparentemente continua até as 24 horas nos tecidos internos, mas não prossegue nos tecidos externos.

Foi observado que o número de knobs analisados foi significativamente maior nos períodos mais curtos e, menor nos mais longos. Por outro lado, foi observada uma ampla variação no número de knobs analisados por núcleo, e também, um menor número de knobs por núcleo nos tecidos internos do que nos externos.

Como o mencionado na metodologia, a escolha dos núcleos para a contagem dos knobs foi feita, de certa maneira, ao acaso. Teve-se o cuidado de se escolher cortes com camadas de células bem definidas e núcleos de células vizinhas. Assim parece existir uma causa para as diferenças observadas nos dados relatados.

No decorrer do presente trabalho, procurou-se sempre movimentar o micrométrico do microscópio, analisando-se todo um núcleo. Nem sempre conseguiu-se abranger todo o núcleo, pelas dificuldades típicas desse tipo de trabalho. Isso pode explicar, pelo menos, parte da variação no número de knobs por núcleo. A tendência significativa da diminuição de knobs em diferentes tecidos, e, em períodos mais longos, exige outra explicação.

É fato amplamente conhecido que os knobs, na fase do paquinema, podem se fundir. Isto é, diferentes knobs se unem formando uma massa única, de onde partem os braços dos cromossomos correspondentes. Poder-se-ia pensar em um comportamento semelhante para os knobs nos núcleos interfásicos. A tendência de fusão aumentaria nos períodos menores de desenvolvimento e seria diversa nos tecidos diferentes. Apesar de não se haver procedido a medição, pode-se observar uma certa diferença de volume nos knobs em função do período de desenvolvimento, porém nenhuma afirmação poderia ser feita sem uma análise mais acurada.

Pequenas diferenças verificadas nos tecidos, fornecem uma indicação de que as mudanças morfológicas são diferentes em cada tipo de tecidos. Se essas diferenças morfológicas são resultado de

atividades metabólicas, então, os knobs teriam atividades diferentes em diferentes tecidos.

Os resultados mostram um certo paralelismo entre o comportamento dos knobs e bandas dos cromossomos politênicos dos dípteros.

Não é intenção com isso afirmar que knobs são regiões dos processos de "puffação" no milho. Algumas pesquisas mais detalhadas e com material mais apropriado devem ser conduzidas, antes de se fazer tais afirmativas. Parece no entanto, válido chamar atenção para esse possível paralelismo, abrindo campo para novas pesquisas interessantes.



## 6. RESUMO E CONCLUSOES

1. O presente trabalho visou o estudo dos knobs cromossômicos nos núcleos interfásicos e sua variabilidade morfológica durante o desenvolvimento nos embriões de milho da raça Zapalote Chico.

2. Foram estudadas células dos tecidos logo abaixo da epiderme da radícula do embrião e células dos tecidos mais internos próximos à região de diferenciação dos tecidos condutores. Os embriões foram colocados em contacto com papel chupão embebido com uma solução nutritiva adequada. Dois embriões, usados como repetição, foram analisados a partir de zero hora e, em períodos de tempo variáveis de 30 em 30 minutos, totalizando 12 horas e, no final de 24 horas. Para cada tecido dez núcleos foram analisados em cada período de tempo, a fim de fazer-se as comparações.

3. Observou-se a existência de três categorias de knobs:

- a) Knobs com muitas regiões fracamente e fortemente coradas, dando a impressão de que a cromatina está organizada na forma de flocos, a que se denominou floculados.

- b) Knobs contendo regiões que se coram fracamente e outras fortemente, dando o aspecto da presença de vacuolado dentro do knob, denominados vacuolados.
- c) Knobs corando-se todo fortemente, denominados densos.

4. A totalidade dos knobs analisados no período correspondente a fase de dormência ou seja a zero hora na solução nutritiva, mostrou o aspecto floculado. Na primeira meia hora de contato com a solução, os knobs na sua grande maioria mudaram para o aspecto denso.

5. Nos períodos mais longos analisados, constatou-se a existência de uma aparente variação cíclica nas frequências dos diversos tipos de knobs, cujas flutuações mostraram um padrão mas não muito definido.

6. Os knobs floculados e vacuolados foram mais frequentes nos estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário, enquanto que, o knob denso diminuiu sua frequência nesses estágios.

7. O número total de knobs foi significativamente maior nos períodos mais curtos enquanto que nos períodos mais longos foi menor. Houve uma ampla variação no número de knobs por núcleo e quando o número total de knobs por núcleo foi alto, ocorreu uma grande frequência dos densos; entretanto quando o número total de knob por núcleo foi baixo, a maior frequência foi do floculado.

8. Verificou-se que houve pequenas diferenças quanto aos tecidos, isto é, um menor número de knobs por núcleo nos tecidos internos do que nos externos.

9. Para um melhor entendimento das causas e conseqüências das alterações morfológicas observadas nos knobs, serão necessários estudos mais detalhados e provavelmente no sentido de verificar uma eventual correlação das alterações morfológicas com o metabolismo de ácidos nucleicos.

## 7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

1. The objective of the present work was the study of chromosomes knobs and their morphological variability in the interfasic nuclei of corn embryos from the race Zapalote Chico.

2. Cells from the tissues just beneath the epidermis of the radicle of the embryo and also cells from the most internal tissues close to the region of differentiation of the vascular tissues were studied. The embryos were placed on filter paper which was imbibed with a nutritive solution. Two embryos used as repetitions, were analysed in each one of the following periods: zero hours, each 30 minutes until 12 hours, and finally 24 hours. In each of the periods mentioned above, ten nuclei were analysed for each tissue.

3. Three classes of the knobs were observed:

- a) Knobs with many regions stained weakly and strongly, showing a flocculated appearance and which were called flocculated knobs.
- b) Knobs that presented regions stained weakly and another stained strongly, showing a vacuolated appearance and which were called vacuolated.

c) Knobs that were strongly, and uniformly stained which were called dense.

4. All analysed knobs in dormant embryo or zero hours in nutritive solution, were flocculated. In the first thirty minutes of contact with the solution, the knobs generally changed of aspect becoming dense.

5. In more advanced stages it was observed one cyclic variation in the frequencies of the three types of the knobs, which fluctuations presented a model apparently definite.

6. Flocculated and vacuolated knobs were more frequent at the most advanced stage of development of the embryo; however, the frequency of the dense knobs decreases in these stages.

7. The total number of knobs was significantly increased in stages with a short time while at the most advanced stage the frequency of knobs decreased. There was variation in the number of the knobs per nuclei and when the total number per nuclei was high an increased frequency of dense knobs was observed; however when the total number of knobs per nuclei was low the less frequent knobs were the flocculated.

8. There was observed a differentiation in the tissues, that is, there was a low number of knobs per nuclei in the most internal tissues and a high number of knobs in the external tissues.

9. In order to determine the nature of the morphological variability of the knobs, further studies will be necessary mainly those related with morphological variability and nucleic acid metabolism.

## 8. LITERATURA CITADA

- BLUMINSCHIN, A. 1964. Identification of chromosome segments that contribute to the specificity of racial characteristics in maize. Ph.D. thesis. Raleigh, North Carolina, U.S.A., North Carolina State of the University of North Carolina. (Mecanografada).
- \_\_\_\_\_. 1965. Citologia do milho e sua possível aplicação no melhoramento. Anais da VI Reunião Brasileira do Milho, Campinas.I.A.C.
- \_\_\_\_\_. 1968. Efeitos da seleção sobre knobs em milho. Ciência e Cultura. 20: Junho 1968.
- \_\_\_\_\_. 1970. Estudos sobre a associação entre knobs cromossômicos e características morfológicas do milho. Relatório Científico de 1970. Instituto de Genética. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 31-39.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York and London - 1ª ed.
- KATO, T.A., e A. Blumenschein. 1967. Complejos de nudos cromosomicos en los maices de America. Em impressão nos Anais da VI Reunião Latinoamericana de Fitotecnia, realizada na Venezuela, em setembro de 1967.

LONGLEY, A.E. 1937. Morphological character of teosinte chromosome.

Jour. Agric. Res. 54: 835-862.

\_\_\_\_\_. 1938. Chromosome of maize from North American Indians.

Jour. Agric. Res. 56: 177-195.

McCLINTOCK, B. 1929. Chromosome morphology in Zea mays. Science.

69: 629.

\_\_\_\_\_. 1930. A cytological demonstration of the location of an

interchange between two non-homologous chromosomes of Zea mays.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 16: 791-796.

MONTEIRO, W. 1964. Knob structure in maize. M. Sc. Thesis. Raleigh,

North Carolina, U.S.A., North Carolina State of the University  
of North Carolina (Mecanografada).

PERONDINI, A.L.P. 1968. Fisiologia dos cromossomos politênicos de

Bradyzia tritici. Tese de doutoramento apresentada à Cadeira  
de Biologia Geral da Faculdade de Filosofia e Letras da Univer-  
sidade de São Paulo.

SNEDECOR, George W. 1957. Statistical Methods applied to experi-

ments in agriculture and biology. The Iowa e State College  
Press, Ames, Iowa. Fifth Ed.

STEEL, Robert, G.D. James H. Torrie. 1960. Principles and Procedu-

res of Statistics with special reference to the biological  
sciences. McGraw-Hill Book Company, Inc.



- VACHHANI, M.V. 1950. A study of the relationship of chromosome knobs with certain agronomic and morphologic characters in corn inbreds. Agron. Jour. 42: 196-201.
- VENCOVSKY, R. e A. Blumenschein. 1969. Observed and "expected" heterosis in interracial crosses of maize. Maize Genetics Cooperation NewsLetter 43: 155-160.
- WANJARI, M.R. e N.W. Widstrom. 1970. Chromosome knobs and resistance to Heliothis zea in maize inbreds. The Journal of Heredity. 61: 171-173.
- WELLHAUSEN, E.J., L.M. Roberts, e E. Hernandez X. 1952. Races of maize in Mexico. The Bussey Institution, Harvard University, Cambridge. 237 pp.

Apêndice 1

Número dos diversos tipos de knobs (F = floculado,  
V = vacuolado, D = denso) observados nos núcleos  
dos tecidos externos.

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	7	6	0	0	0	0	7	6
2	5	7	0	0	0	0	5	7
3	6	8	0	0	0	0	6	8
4	8	5	0	0	0	0	8	5
5	5	5	0	4	0	0	5	9
6	6	7	0	0	0	0	6	7
7	8	4	0	0	0	2	8	6
8	6	5	0	0	0	0	6	5
9	4	6	0	0	0	0	4	6
10	6	7	0	0	0	0	6	7
TOTAIS	61	60	0	4	0	2	61	66

0,0 Hora na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	3	0	0	1	17	11	20	12
2	2	0	0	2	14	10	16	12
3	3	1	0	0	16	14	19	15
4	2	0	●	1	14	9	16	10
5	1	1	2	0	12	10	15	11
6	4	0	0	0	7	13	11	13
7	2	3	0	0	12	8	14	11
8	0	0	3	1	16	12	19	13
9	3	1	1	0	14	11	18	12
10	2	3	0	0	8	8	10	11
TOTAIS	22	9	6	5	130	106	158	120

0,5 Hora na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	5	3	0	0	8	5	13	8
2	2	0	0	0	7	10	9	10
3	1	2	0	1	9	6	10	9
4	4	3	0	3	7	4	11	10
5	2	4	0	1	9	5	11	10
6	1	3	0	1	10	7	11	11
7	2	1	0	2	7	6	9	9
8	2	3	0	2	10	5	12	10
9	4	2	1	1	9	6	14	9
10	3	3	0	0	7	9	10	12
TOTAIS	26	24	1	11	83	63	110	98

1,0 Hora na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	2	2	0	0	8	8	10	10
2	2	1	0	0	10	10	12	11
3	4	1	0	3	8	6	12	10
4	3	2	1	0	6	8	10	10
5	0	1	2	0	9	8	11	9
6	1	4	2	0	7	9	10	13
7	0	3	4	1	10	7	14	11
8	1	1	0	0	10	10	11	11
9	0	1	1	1	14	8	15	10
10	1	3	2	1	9	6	12	10
TOTAIS	14	19	12	6	91	80	117	105

1,5 Hora na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	0	2	1	1	10	12	11	15
2	1	1	0	0	10	8	11	9
3	0	3	0	0	12	10	12	13
4	0	0	0	1	10	11	10	12
5	0	0	0	2	12	8	12	10
6	0	0	0	1	12	10	12	11
7	0	0	0	2	10	9	10	11
8	1	2	0	0	11	10	12	12
9	0	2	0	0	10	10	10	12
10	0	2	0	0	12	8	12	10
TOTAIS	2	12	1	7	109	96	112	115

2,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	3	5	1	0	7	5	11	10
2	0	2	1	0	12	8	13	10
3	0	3	3	0	9	7	12	10
4	0	3	2	0	8	11	10	14
5	2	1	1	0	7	12	10	13
6	1	0	0	2	9	10	10	12
7	0	5	1	0	9	8	10	13
8	1	1	0	0	11	10	12	11
9	3	3	0	0	9	11	12	14
10	2	0	0	1	10	11	12	12
TOTAIS	12	23	9	3	91	93	112	119

2,5 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	1	3	0	0	12	10	13	13
2	1	1	0	1	14	12	15	14
3	2	1	0	0	12	12	14	13
4	2	2	1	0	12	12	15	14
5	2	3	0	0	9	8	11	11
6	3	3	0	0	10	10	13	13
7	4	1	0	0	10	13	14	14
8	2	2	0	0	10	12	12	14
9	2	4	0	0	10	9	12	13
10	0	1	1	0	13	11	14	12
TOTAIS	19	21	2	1	112	109	133	131

3,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	1	5	0	0	11	9	12	14
2	2	4	0	0	7	6	9	10
3	0	2	0	0	12	14	12	16
4	1	4	0	0	8	10	9	14
5	2	4	0	0	10	12	12	16
6	3	3	0	1	8	10	11	14
7	4	2	0	1	8	13	12	16
8	2	4	1	0	10	10	13	14
9	2	2	0	0	8	6	10	8
10	1	3	1	0	8	9	10	12
TOTAIS	18	33	2	2	90	99	110	134

3,5 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	0	4	0	0	6	0	6	4
2	4	3	0	0	5	9	9	12
3	2	0	0	4	8	4	10	8
4	4	0	0	3	5	7	9	10
5	3	2	0	0	8	8	11	10
6	2	2	0	1	7	6	9	9
7	1	1	1	0	5	9	7	10
8	4	0	0	1	6	9	10	10
9	3	1	1	4	6	3	10	8
10	3	1	0	0	10	9	13	10
TOTAIS	26	14	2	13	66	64	94	91

## 4,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	3	0	0	4	3	8	6	12
2	3	0	0	5	8	5	11	10
3	5	1	1	3	4	6	10	10
4	0	1	4	2	5	5	9	8
5	0	4	3	0	6	6	9	10
6	2	0	2	3	5	6	9	9
7	1	2	3	1	7	7	11	10
8	0	1	3	2	7	8	10	11
9	0	3	3	1	4	6	7	10
10	0	0	4	4	6	5	10	9
TOTAIS	14	12	23	25	55	62	92	99

## 4,5 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	1	0	2	2	6	10	9	12
2	2	0	0	2	10	9	12	11
3	0	0	2	1	7	6	9	7
4	2	0	0	3	6	8	8	11
5	4	0	1	2	4	10	9	12
6	0	2	2	0	8	9	10	11
7	0	2	5	1	6	10	11	13
8	3	0	0	4	5	8	8	12
9	1	1	2	1	7	8	10	10
10	3	3	0	0	7	5	10	8
TOTAIS	16	8	14	16	66	83	96	107

5,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	4	1	1	2	4	4	9	7
2	0	2	2	1	8	6	10	9
3	2	1	3	0	5	8	10	9
4	1	2	4	1	6	5	11	8
5	4	2	0	0	5	7	9	9
6	3	2	1	1	6	8	10	11
7	1	1	1	1	10	7	12	9
8	2	0	0	1	10	9	12	10
9	2	1	0	0	10	10	12	11
10	2	1	1	0	7	7	10	8
TOTAIS	21	13	13	7	71	71	105	91

5,5 Horas na Solução Nutritiva



Lâmina Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1		3	1	4	1	2	6	9	8
2		2	2	0	0	6	10	8	12
3		2	0	1	2	4	12	7	14
4		1	2	1	0	6	8	8	10
5		2	1	0	3	5	7	7	11
6		3	1	1	2	6	11	10	14
7		5	0	0	3	4	8	9	11
8		1	0	0	1	7	9	8	10
9		1	0	1	1	9	12	11	13
10		3	0	2	1	5	10	10	11
TOTALS		23	7	10	14	54	93	87	114

6,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1		1	1	5	5	1	6	7	12
2		2	3	2	0	5	7	9	10
3		2	2	0	0	7	10	9	12
4		1	4	4	1	3	5	8	10
5		0	2	6	1	2	9	8	12
6		4	1	0	3	6	6	10	10
7		5	1	0	2	1	5	6	8
8		5	4	1	0	2	8	8	12
9		0	4	7	2	2	4	9	10
10		0	2	8	1	3	6	11	9
TOTALS		20	24	33	15	32	66	85	105

6,5 Horas na Solução Nutritiva

Lamina \ Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1		2	1	0	1	7	8	9	10
2		1	0	0	2	7	9	8	11
3		1	0	1	3	6	10	8	13
4		1	0	0	1	8	14	9	15
5		1	4	2	0	8	7	11	11
6		1	3	0	0	6	7	7	10
7		0	1	2	1	8	9	10	11
8		1	1	0	1	9	7	10	9
9		0	0	1	2	7	10	8	12
10		1	1	1	1	9	8	11	10
TOTAIS		9	11	7	12	75	89	91	112

7,0 Horas na Solução Nutritiva

Lamina \ Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1		8	6	0	2	0	0	8	8
2		9	7	1	0	0	1	10	8
3		9	4	1	2	0	4	10	10
4		6	6	3	0	2	2	11	8
5		6	5	4	4	2	0	12	9
6		6	5	1	4	1	3	8	12
7		5	1	0	5	5	1	10	7
8		9	5	0	3	4	1	13	9
9		6	3	0	3	5	3	11	9
10		5	2	4	4	2	2	11	8
TOTAIS		69	44	14	27	21	17	104	88

7,5 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1		5	3	0	1	2	3	7	7
2		3	2	1	1	3	4	7	7
3		5	0	0	4	2	2	7	6
4		1	5	1	1	6	3	8	9
5		3	2	2	3	2	5	7	10
6		2	4	2	1	4	2	8	7
7		2	0	2	4	5	2	9	6
8		4	2	1	3	2	3	7	8
9		3	0	1	4	3	5	7	9
10		5	0	3	4	2	3	10	7
TOTAIS		33	18	13	26	31	32	77	76

8,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1		0	0	7	5	2	3	9	8
2		0	0	4	4	3	2	7	6
3		0	0	6	5	3	3	9	8
4		0	0	5	4	3	3	8	7
5		0	1	5	4	4	4	9	9
6		0	0	4	6	4	3	8	9
7		0	3	3	2	2	2	5	7
8		0	5	7	2	2	2	9	9
9		0	1	4	4	4	1	8	6
10		0	2	5	4	4	2	9	8
TOTAIS		0	12	50	40	31	25	81	77

8,5 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	2	0	2	0	3	5	7	5
2	4	3	1	1	2	2	7	6
3	4	2	1	1	3	4	8	7
4	3	2	2	0	2	5	7	7
5	3	4	0	1	5	2	8	7
6	3	3	0	0	3	5	6	8
7	2	2	1	1	5	3	8	6
8	2	1	3	2	3	2	8	5
9	2	1	1	1	4	4	7	6
10	1	1	0	0	5	5	6	6
TOTAIS	26	19	11	7	35	37	72	63

9,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	5	4	2	3	1	1	8	8
2	3	5	4	1	2	2	9	8
3	3	4	1	1	2	3	6	8
4	1	3	0	1	5	2	6	6
5	4	5	2	0	2	1	8	6
6	1	3	1	2	6	2	8	7
7	3	3	1	1	3	4	7	8
8	1	4	2	2	4	3	7	9
9	1	3	2	0	5	2	8	5
10	1	1	1	0	4	5	6	6
TOTAIS	23	35	16	11	34	25	73	71

9,5 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1	1	1	0	1	7	4	8	6	
2	0	3	2	1	5	5	7	9	
3	1	4	1	2	7	3	9	9	
4	1	3	3	4	5	3	9	10	
5	1	1	0	0	8	5	9	6	
6	1	3	0	1	5	5	6	9	
7	2	2	0	0	6	5	8	7	
8	0	3	1	1	7	4	8	8	
9	2	2	0	2	5	4	7	8	
10	3	2	0	2	6	6	9	10	
TOTAIS		12	24	7	14	61	44	80	82

10,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1	0	7	5	2	3	3	8	12	
2	3	7	0	0	1	2	4	9	
3	5	3	0	0	2	5	7	8	
4	4	4	1	1	2	2	7	7	
5	6	0	0	1	3	6	9	7	
6	4	1	0	1	5	6	9	8	
7	5	2	0	1	3	4	8	7	
8	0	1	2	0	6	6	8	7	
9	2	0	3	2	3	7	8	9	
10	5	1	2	0	4	8	11	9	
TOTAIS		34	26	13	8	32	49	79	83

10,5 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	5	3	1	4	2	0	8	7
2	3	5	1	2	2	1	6	8
3	5	2	0	3	0	3	5	8
4	5	3	3	2	0	2	8	7
5	3	2	3	3	0	2	6	7
6	6	3	0	2	1	3	7	8
7	3	1	1	2	4	5	8	8
8	5	5	1	1	2	2	8	8
9	3	4	3	2	4	2	10	8
10	5	4	0	3	2	2	7	9
TOTAIS	43	32	13	24	17	22	73	78

11,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	0	4	2	0	7	3	9	7
2	1	2	1	0	8	6	10	8
3	4	2	1	2	5	3	10	7
4	5	1	0	3	6	4	11	8
5	4	3	0	0	5	4	9	7
6	2	4	0	0	6	0	8	4
7	2	1	0	0	6	6	8	7
8	1	1	0	0	5	4	6	5
9	1	3	0	1	7	5	8	9
10	3	3	0	3	7	4	10	10
TOTAIS	23	24	4	9	62	39	89	72

11,5 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	3	4	0	0	6	3	9	7
2	0	3	3	0	5	4	8	7
3	1	1	0	0	5	7	6	8
4	3	0	0	1	4	6	7	7
5	2	2	0	1	4	5	6	8
6	1	2	2	1	5	7	8	10
7	3	3	0	1	4	3	7	7
8	3	4	0	0	7	3	10	7
9	1	2	0	1	8	5	9	8
10	3	2	1	0	4	4	8	6
TOTAIS	20	23	6	5	52	47	78	75

12,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	3	4	2	1	4	3	9	8
2	4	3	1	0	3	5	8	8
3	1	2	0	0	7	6	8	8
4	1	0	1	3	8	7	10	10
5	0	4	0	0	9	5	9	9
6	3	2	0	1	7	6	10	9
7	1	0	0	0	6	7	7	7
8	4	4	0	0	5	3	9	7
9	4	2	1	1	5	6	10	9
10	2	1	1	2	3	6	6	9
TOTAIS	23	22	6	8	57	54	86	84

24,0 Horas na Solução Nutritiva

Apêndice 2

Número dos diversos tipos de knobs (F = floculado,  
V = vacuolado, D = denso) observados nos núcleos  
dos tecidos internos.



Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	12	8	0	0	0	0	12	8
2	12	6	0	0	0	0	12	6
3	9	9	0	0	0	0	9	9
4	8	6	0	0	0	0	8	6
5	8	6	0	0	0	0	8	6
6	6	9	0	0	0	0	6	9
7	9	7	0	0	0	0	9	7
8	10	4	0	0	0	0	10	4
9	9	6	0	0	0	0	9	6
10	11	8	0	0	0	0	11	8
TOTAIS	94	69	0	0	0	0	94	69

0,0 Hora na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	3	0	0	1	7	12	10	13
2	0	1	1	1	9	10	10	12
3	0	0	2	2	10	8	12	10
4	1	0	1	3	9	7	11	10
5	2	1	0	1	9	8	11	10
6	3	0	0	2	9	10	12	12
7	2	5	0	0	7	8	9	13
8	0	3	2	0	9	9	11	12
9	0	1	1	1	10	11	11	13
10	0	1	2	1	11	8	13	10
TOTAIS	11	12	9	12	90	91	110	115

0,5 Hora na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	1	3	0	0	9	7	10	10
2	4	1	1	2	6	9	11	12
3	5	2	0	4	4	6	9	12
4	3	1	0	1	5	5	8	7
5	1	0	1	5	8	3	10	8
6	0	2	2	1	10	6	12	9
7	7	3	0	2	5	6	12	11
8	3	-	0	3	7	8	10	11
9	1	3	0	1	8	4	9	8
10	1	1	0	3	9	6	10	10
TOTAIS	26	16	4	22	71	60	101	98

1,0 Hora na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	1	5	2	0	8	6	11	11
2	2	3	1	0	6	8	9	11
3	2	2	2	0	10	9	14	11
4	1	3	1	0	11	8	13	11
5	3	3	0	0	9	10	12	13
6	2	0	0	1	10	8	12	9
7	3	4	1	1	10	7	14	12
8	4	2	1	0	8	8	13	10
9	5	1	0	1	6	6	11	8
10	1	5	2	0	7	5	10	10
TOTAIS	24	28	10	3	85	75	119	106

1,5 Hora na Solução Nutritiva

= 67 =

		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Lâmina	Núcleos								
	1	0	1	3	0	7	7	10	8
	2	0	1	1	3	10	2	11	6
	3	0	0	1	3	7	4	8	7
	4	0	1	1	0	8	4	9	5
	5	0	0	1	5	7	3	8	8
	6	0	0	1	6	6	2	7	8
	7	0	0	3	4	5	7	8	11
	8	0	0	1	6	7	1	8	7
	9	1	0	1	2	6	5	8	7
	10	0	0	1	5	9	2	10	7
TOTAIS		1	3	14	34	72	37	87	74

2,0 Horas na Solução Nutritiva

		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Lâmina	Núcleos								
	1	5	2	1	0	2	6	8	8
	2	5	0	1	0	1	6	7	6
	3	6	0	0	1	0	10	6	11
	4	1	3	2	0	3	4	6	7
	5	0	2	5	0	3	6	8	8
	6	0	0	7	1	2	7	9	8
	7	0	0	2	3	5	5	7	8
	8	0	2	5	0	3	5	8	7
	9	0	1	5	0	2	6	7	7
	10	0	1	7	2	1	5	8	8
TOTAIS		17	11	35	7	22	60	74	78

2,5 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	3	1	2	1	3	1	8	3
2	0	0	2	3	6	4	8	7
3	0	0	4	2	3	5	7	7
4	0	0	4	2	8	5	12	7
5	0	0	2	1	7	8	9	9
6	1	0	3	0	2	5	6	5
7	0	0	4	4	2	5	6	9
8	2	0	1	2	4	5	7	7
9	0	1	1	1	8	6	9	8
10	3	0	1	4	2	3	6	7
TOTAIS	9	2	24	20	45	47	78	69

3,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	1	0	1	0	10	13	12	13
2	1	1	2	1	6	10	9	12
3	1	0	1	0	8	10	10	10
4	0	0	0	1	10	8	10	9
5	0	1	1	0	11	12	12	13
6	0	2	1	2	9	8	10	12
7	0	0	1	1	10	11	11	12
8	0	0	1	0	6	10	7	10
9	0	0	1	0	11	9	12	9
10	1	0	0	0	7	12	8	12
TOTAIS	4	4	9	5	88	103	101	112

3,5 Horas na Solução Nutritiva

		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Lâmina	Núcleos								
	1	0	2	1	1	8	12	9	15
	2	0	0	2	3	5	6	7	9
	3	0	0	0	1	9	8	9	9
	4	0	0	0	2	8	6	8	8
	5	0	1	0	5	6	0	6	6
	6	0	0	0	6	9	1	9	7
	7	0	1	0	7	11	0	11	8
	8	0	0	2	4	6	2	8	6
	9	0	1	0	4	8	3	8	8
	10	1	0	1	1	4	7	6	8
TOTAIS		1	5	6	34	74	45	81	84

4,0 Horas na Solução Nutritiva

		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Lâmina	Núcleos								
	1	0	0	6	5	2	0	8	5
	2	1	0	5	7	0	1	6	8
	3	0	2	8	3	0	0	8	5
	4	0	2	5	3	3	3	8	8
	5	2	2	6	2	0	2	8	6
	6	0	1	7	4	1	1	8	6
	7	0	0	6	6	0	1	6	7
	8	0	0	4	5	3	2	7	7
	9	1	1	5	3	1	3	7	7
	10	0	0	6	6	0	2	6	8
TOTAIS		4	8	58	44	10	15	72	67

4,5 Horas na Solução Nutritiva

		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Lâmina	Núcleos								
1	1	0	3	7	1	2	2	9	6
2	2	0	0	4	5	3	5	7	10
3	3	1	3	5	2	0	1	6	6
4	4	0	0	5	5	0	3	5	8
5	5	0	3	3	3	5	2	8	8
6	6	1	2	6	5	2	1	9	8
7	7	1	2	4	4	0	0	5	6
8	8	2	1	1	6	5	1	8	8
9	9	0	3	5	2	3	1	8	6
10	10	0	1	6	6	0	2	6	9
TOTAIS		5	18	46	39	20	18	71	75

5,0 Horas na Solução Nutritiva

		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Lâmina	Núcleos								
1	1	1	1	4	1	2	5	7	7
2	2	1	0	1	3	3	5	5	8
3	3	2	0	0	2	5	6	7	8
4	4	1	0	1	4	3	3	5	7
5	5	4	0	0	4	0	3	4	7
6	6	5	1	0	1	0	5	5	7
7	7	4	1	2	2	0	5	6	8
8	8	0	2	4	2	3	3	7	7
9	9	1	1	3	1	3	5	7	7
10	10	4	0	0	2	3	5	7	7
TOTAIS		23	6	15	22	22	45	60	73

5,5 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	5	2	2	0	1	6	8	8
2	4	3	0	0	0	7	4	10
3	3	4	0	0	1	10	4	14
4	6	4	0	0	0	3	6	7
5	3	2	0	0	2	8	5	10
6	4	2	1	0	0	6	5	8
7	2	2	0	2	3	4	5	8
8	5	3	0	1	0	4	5	8
9	5	2	0	3	2	6	7	11
10	4	0	0	0	3	9	7	9
TOTAIS	41	24	3	6	12	63	56	93

6,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	4	0	0	6	0	0	4	6
2	2	4	0	0	0	1	2	5
3	5	2	0	4	0	0	5	6
4	4	3	0	0	0	2	4	5
5	3	1	0	1	0	5	3	7
6	4	4	0	2	0	0	4	6
7	4	2	0	0	4	3	8	5
8	2	6	2	0	5	0	9	6
9	0	6	2	0	8	2	10	8
10	2	7	1	0	1	1	4	8
TOTAIS	30	35	5	13	18	14	53	62

6,5 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	1	0	0	1	6	11	7	12
2	1	1	0	0	7	5	8	6
3	1	0	0	0	5	6	6	6
4	0	2	0	0	9	7	9	9
5	2	0	0	0	8	9	10	9
6	0	0	0	0	7	11	7	11
7	1	2	0	0	5	2	6	10
8	3	2	0	0	5	6	8	8
9	2	0	0	0	7	10	9	10
10	2	3	0	0	6	5	8	8
TOTAIS	13	10	0	1	65	78	78	89

## 7,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	7	4	0	0	0	0	7	4
2	8	3	0	0	0	6	8	9
3	5	4	0	1	0	0	5	5
4	7	4	1	0	0	2	8	6
5	5	3	1	1	0	1	6	5
6	4	4	2	0	3	3	9	7
7	4	6	0	0	3	1	7	7
8	5	4	2	0	1	0	8	4
9	6	3	0	1	1	2	7	6
10	3	5	1	0	2	2	6	7
TOTAIS	54	40	7	3	10	17	71	60

## 7,5 Horas na Solução Nutritiva



Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	5	3	3	3	1	2	9	8
2	6	6	2	0	0	0	8	6
3	4	5	0	1	3	2	7	8
4	3	4	0	0	3	1	6	5
5	5	7	1	0	0	0	6	7
6	0	6	0	0	6	0	6	6
7	1	8	0	0	4	0	5	8
8	0	5	3	0	2	2	5	7
9	3	6	1	0	3	1	7	7
10	3	6	2	0	2	2	7	8
TOTAIS	30	56	12	4	24	10	66	70

8,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos	F		V		D		TOTAL	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	0	2	4	3	1	2	5	7
2	1	3	3	0	5	1	9	4
3	3	0	1	5	3	0	7	5
4	1	0	4	6	2	1	7	7
5	0	0	6	7	1	2	7	9
6	1	0	2	4	2	0	5	4
7	0	1	2	5	2	0	4	6
8	2	0	0	8	3	0	5	8
9	1	2	2	3	4	1	7	6
10	2	4	2	0	2	1	6	5
TOTAIS	11	12	26	41	25	8	62	61

8,5 Horas na Solução Nutritiva

= 74 =

Lâmina Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1		5	0	0	0	2	6	7	6
2		0	0	0	0	8	7	8	7
3		3	1	0	0	3	6	6	7
4		3	0	0	0	2	7	5	7
5		5	0	0	0	2	6	7	6
6		0	0	0	0	5	8	5	8
7		1	0	1	0	3	7	5	7
8		4	1	0	0	3	6	7	7
9		0	2	0	0	6	5	6	7
10		2	0	0	1	4	4	6	5
TOTAIS		23	4	1	1	38	62	62	67

9,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1		3	0	5	2	2	4	10	6
2		1	2	3	1	2	4	6	7
3		1	4	2	0	1	2	4	6
4		1	3	0	2	6	1	7	6
5		1	3	1	0	5	3	7	6
6		2	1	0	1	8	4	10	6
7		4	1	1	1	1	4	6	6
8		6	3	0	0	1	4	7	7
9		5	4	0	1	4	5	9	10
10		4	2	0	1	6	4	10	7
TOTAIS		28	23	12	9	36	35	76	67

9,5 Horas na Solução Nutritiva

= 75 =

Lâmina Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1		2	0	0	0	7	7	9	7
2		2	3	1	0	6	3	9	6
3		3	0	0	0	4	9	7	9
4		0	0	2	0	6	8	8	8
5		0	1	2	1	7	6	9	8
6		0	0	2	0	4	7	6	7
7		0	0	3	1	5	5	8	6
8		0	0	1	1	6	6	7	7
9		2	0	1	0	4	9	7	9
10		1	0	0	0	6	7	7	7
TOTALS		10	4	12	3	55	67	77	74

10,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1		4	0	0	1	2	7	6	8
2		6	0	0	2	0	5	6	7
3		4	1	0	0	1	8	5	9
4		5	2	0	0	2	6	7	8
5		3	3	2	0	3	4	8	7
6		4	0	1	0	1	9	6	9
7		0	0	1	0	6	8	7	8
8		2	1	1	1	5	7	8	8
9		1	1	0	1	6	7	7	9
10		2	1	0	1	5	6	7	8
TOTALS		31	9	5	5	31	67	67	81

10,5 Horas na Solução Nutritiva

		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Lâmina	Núcleos								
1	1	4	2	2	3	1	3	7	8
	2	2	1	2	1	2	1	6	3
	3	0	2	7	0	0	5	7	7
	4	3	1	4	2	1	4	8	7
	5	2	0	1	4	4	3	7	7
	6	4	2	2	3	2	4	8	9
	7	1	1	6	4	0	3	7	8
	8	0	0	5	5	1	2	6	7
	9	4	0	3	5	2	1	9	6
	10	3	1	0	6	4	1	7	8
TOTALS		23	10	32	33	17	27	72	70

11,0 Horas na Solução Nutritiva

		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Lâmina	Núcleos								
1	1	0	2	2	0	5	5	7	7
	2	0	0	0	0	9	8	9	8
	3	2	0	0	0	5	7	7	7
	4	1	0	1	0	4	6	6	6
	5	1	0	0	0	5	9	6	9
	6	0	1	1	0	6	7	7	8
	7	0	0	1	0	7	10	8	10
	8	0	1	0	0	8	9	8	10
	9	0	1	4	0	2	6	6	7
	10	2	0	1	0	5	7	8	7
TOTALS		6	5	10	0	56	74	72	79

11,5 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1		4	3	2	1	3	5	9	9
2		3	1	2	0	3	5	8	6
3		2	0	0	0	7	7	9	7
4		1	1	0	0	6	5	7	6
5		0	1	3	1	5	4	8	6
6		1	3	0	0	8	4	9	7
7		2	1	0	0	7	7	9	8
8		2	0	0	0	6	7	8	7
9		2	1	0	0	9	6	11	7
10		1	1	0	2	7	5	8	8
TOTAIS		18	12	7	4	60	55	85	71

12,0 Horas na Solução Nutritiva

Lâmina Núcleos		F		V		D		TOTAL	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1		5	0	2	0	0	6	7	6
2		3	0	2	0	0	6	5	6
3		3	1	1	0	4	5	8	6
4		1	0	0	1	3	5	4	6
5		2	2	0	3	5	3	7	8
6		3	1	0	2	4	6	7	9
7		2	3	0	0	4	4	6	7
8		1	2	0	0	6	5	7	7
9		2	4	1	0	6	2	9	6
10		1	1	2	0	6	4	9	5
TOTAIS		23	14	8	6	38	46	69	66

24,0 Horas na Solução Nutritiva

### Apêndice 3

Dados referentes a análise do  $X^2$  empregada para testar a distribuição dos knobs floculados, vacuolados e densos nos tecidos externos e internos.

Causa de Variação	Floc. Externo		Floc. Interno		Vac. Externo		Vac. Interno		Denso Externo		Denso Interno	
	1ªRep.	2ªRep.	1ªRep.	2ªRep.	1ªRep.	2ªRep.	1ªRep.	2ªRep.	1ªRep.	2ªRep.	1ªRep.	2ªRep.
G.L.												
Regressão Linear	80,71 ***	64,42 ***	59,39 ***	4,51 *	63,30 ***	47,60 ***	0,39 n.s.	6,43 *	176,52 ***	141,47 ***	37,92 ***	0,16 n.s.
Desvios da Regressão	229,03 ***	138,46 ***	409,31 ***	353,23 ***	253,60 ***	240,57 ***	480,68 ***	466,35 ***	218,70 ***	225,61 ***	479,10 ***	462,10 ***
Total	309,74 ***	202,88 ***	468,70 ***	357,74 ***	316,90 ***	288,17 ***	481,07 ***	472,78 ***	395,22 ***	367,08 ***	517,02 ***	462,26 ***