

HERALDO S. DE VASCONCELOS SAMPAIO
ENGENHEIRO - AGRÔNOMO

Auxiliar de Ensino do Departamento de Fitotecnia da
Escola de Agronomia da U. F. Ba.

**ESTUDOS CITOLÓGICOS DE CAMADAS SIMPLES E MÚLTIPLAS
DE ALEURONA, EM DIFERENTES VARIEDADES DE MILHO
(Zea mays L.)**

Prof. Dr. ALMIRO BLUMENSCHIEIN
Orientador

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universi-
dade de São Paulo, para obtenção do título
de "Mestre".

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo Brasil
1 9 7 6

A um incansável idealista e sua devotada
esposa: meus pais.

AGRADECIMENTOS

Oportunamente desejamos prestar o nosso agradecimento às seguintes pessoas e instituições, às quais estivemos ligados durante a realização deste trabalho:

1 - Ao Prof. Dr. Almiro Blumenschein pela valiosa orientação e sugestões e pelo apoio humano que nos dedicou.

2 - Aos Professores, Funcionários e trabalhadores da E.S.A. "Luiz de Queiroz", especialmente os do Departamento de Genética por tudo que fizeram pela nossa pessoa e pela amizade que nos dedicaram durante todo o período de curso.

3 - Ao antigo Instituto de Pesquisas Agropecuário do Leste por ter consentido na realização desse Curso de Pós-Graduação e assim tornado possível a execução deste trabalho.

4 - Ao Conselho Nacional de Pesquisas, pela bolsa de estudos concedida.

5 - À EMBRAPA por ter custeado uma etapa do nosso curso.

C O N T E Ú D O

	Página
LISTA DOS QUADROS	VI
LISTA DAS FIGURAS	VIII
LISTA DAS FOTOGRAFIAS	IX
LISTA DO APÊNDICE	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Estrutura do grão e localização da camada de aleurona	4
2.2. Estrutura da camada de aleurona	5
2.3. Peso da camada de aleurona em relação ao grão	7
2.4. Composição da camada de aleurona com relação a aminoácidos, vitaminas e proteína	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Estudo das dimensões das células	13
3.1.1. Estimativa para todo o grão	13
3.1.1.1. Variedades utilizadas, suas ori- gens e tipos	14
3.1.1.2. Técnicas citológicas emprega- das	14
3.1.2. Estimativa para uma pequena região do grão	21
3.1.2.1. Variedades utilizadas, suas ori- gens e tipos	21
3.1.2.2. Técnicas citológicas emprega- das	22

3.2. Estudo da frequência de aleurona múltipla em diferentes variedades	23
3.3. Estudo de correlação entre as dimensões do grão e das células de aleurona	24
3.4. Metodologia estatística	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Estimativa para todo o grão	27
4.1.1. Comprimento e largura das células	29
4.1.2. Espessura das células	30
4.1.3. Área das células	33
4.1.4. Volume das células	35
4.2. Estimativa para uma pequena região do grão	37
4.2.1. Comprimento e largura das células	39
4.2.2. Espessura das células	39
4.2.3. Área das células	41
4.2.4. Volume das células	42
4.3. Estudo da frequência de aleurona múltipla em diferentes variedades	44
4.4. Estudo de correlação entre as dimensões do grão e das células de aleurona	44
4.5. Ilustração - fotografias	45
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	61
7. RESUMO	63
8. SUMMARY	65
9. LITERATURA CITADA	67

LISTA DOS QUADROS

QUADROS ENCONTRADOS NA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

	Página
I . Teores de vitamina B nas diferentes frações do trigo	9
II . Distribuição percentual da proteína bruta no milho e trigo	10

QUADROS ENCONTRADOS NOS RESULTADOS, REFERENTES AO ESTUDO DA "ESTIMATIVA PARA TODO O GRÃO"

III . Classificação das variedades em ordem decrescente, segundo as médias dos parâmetros estudados.	28
IV . Médias das variedades para comprimento e largura das células	29
V . Médias das variedades para espessura das células	32
VI . Médias das variedades para área das células . .	34
VII . Médias das variedades para volume das células .	36

QUADROS ENCONTRADOS NOS RESULTADOS REFERENTES AO ESTUDO DA "ESTIMATIVA PARA UMA PEQUENA REGIÃO DO GRÃO"

VIII . Classificação das variedades em ordem decrescente, segundo as médias dos parâmetros estudados.	38
IX . Médias das variedades para comprimento e largura das células	39

	Página
X . Médias das variedades para espessura das células	40
XI . Médias das variedades para área das células	41
XII . Médias das variedades para volume das células	43

QUADRO ENCONTRADO NOS RESULTADOS, REFERENTE AO ESTUDO DE CORRELAÇÃO ENTRE AS DIMENSÕES DO GRÃO E DAS CÉLULAS DE ALEURONA

XIII . Coeficientes de correlação	45
---	----

LISTA DAS FIGURAS

	Página
Fig. 1 . Posições dos cortes longitudinais e transversais no estudo da estimativa para todo o grão	16
Fig. 2 . Disposição da célula em relação ao grão . . .	18
Fig. 3 . Posições dos cortes longitudinais e transversais no estudo da estimativa para uma pequena região do grão	23
Fig. 4 . Modelos de implantação das células	55

LISTA DAS FOTOGRAFIAS

	Página
Fotog. 1 . Corte longitudinal na variedade Centralmex.	46
Fotog. 2 . Corte transversal na variedade Opaco 2 . .	46
Fotog. 3 . Corte longitudinal na variedade Opaco 2 . .	47
Fotog. 4 . Corte transversal na variedade Ceará 147 .	47
Fotog. 5 . Corte longitudinal na variedade Bolívia II.	48
Fotog. 6 . Corte longitudinal na variedade Paraguai V.	48
Fotog. 7 - Corte transversal na variedade Paraguai V .	49
Fotog. 8 . Corte longitudinal na variedade Paraguai V.	49
Fotog. 9 . Corte longitudinal na variedade Bolívia II.	50

LISTA DO APÊNDICE

QUADROS REFERENTES AO ESTUDO DA "ESTIMATIVA PARA TODO O GRÃO"

	Página
XIV . Análise da variância para comprimento das células	71
XV . Análise da variância para largura das células	71
XVI . Análise da variância para espessura das células - 1ª camada	72
XVII . Análise da variância para espessura das células 1ª camada + 2ª camada	72
XVIII . Análise da variância para espessura das células - 1ª camada versus 2ª camada	73
XIX . Análise da variância para área das células - 1ª camada	74
XX . Análise da variância para área das células - média entre a 1ª e 2ª camada	74
XXI . Análise da variância para área das células - 1ª camada versus 2ª camada	75
XXII . Análise da variância para volume das células - 1ª camada	76
XXIII . Análise da variância para volume das células - média entre a 1ª e 2ª camada	76
XXIV . Análise de variância para volume das células - 1ª camada versus 2ª camada	77

QUADROS REFERENTES AO ESTUDO DA "ESTIMATIVA PA-
RA UMA PEQUENA REGIÃO DO GRÃO"

	Página
XXV . Análise da variância para comprimento das células	78
XXVI . Análise da variância para largura das células	78
XXVII . Análise da variância para espessura das células - 1ª camada	79
XXVIII . Análise da variância para espessura das células - 1ª camada + 2ª camada	79
XXIX . Análise da variância para espessura das células - 1ª camada versus 2ª camada	80
XXX . Análise da variância para área das células - 1ª camada	80
XXXI . Análise da variância para área das células - média entre a 1ª e 2ª camada	81
XXXII . Análise da variância para área das células - 1ª camada versus 2ª camada	81
XXXIII . Análise da variância para volume das células - 1ª camada	81
XXXIV . Análise da variância para volume das células - média entre a 1ª e 2ª camada	82
XXXV . Análise da variância para volume das células - 1ª camada versus 2ª camada	82

QUADROS DOS VALORES MÉDIOS DOS GRÃOS DE CADA
VARIEDADE, REFERENTES AO ESTUDO DA "ESTIMATI-
VA PARA TODO O GRÃO"

	Página
XXXVI . Valores médios dos grãos da variedade Ceará 147	83
XXXVII . Valores médios dos grãos da variedade Opaco 2	84
XXXVIII . Valores médios dos grãos da variedade Central mex	85
XXXIX . Valores médios dos grãos da variedade Compos- to	86
XL . Valores médios dos grãos da variedade Bolívia I	87
XLI . Valores médios dos grãos da variedade Bolívia II	88
XLII . Valores médios dos grãos da variedade Para- guai V	89

1 . INTRODUÇÃO

Existe uma tendência do melhoramento vegetal nos últimos anos, para unir-se a produtividade à qualidade dos alimentos produzidos, tanto para a alimentação humana, como para a animal. Alguns programas têm sido executados em diferentes culturas, com o objetivo, além do aumento da produtividade, de melhorar a qualidade como: teor proteico, teor de ôleo, dosagem de aminoácidos essenciais, provitaminas, pigmentos, amido etc.

O aumento do teor proteico no milho, atualmente, tem sido alvo de grande interesse para os melhoristas, principalmente por ser ele um cereal de grande importância para a alimentação da humanidade.

Uma das maiores descobertas no sentido de aumentar o valor proteico no milho foi feita por MERTZ et al (1964). Eles descobriram que o gene "Opaco 2" condiciona um teor de lisina que chega a ser 69% maior que o do milho normal. Outro gene importante foi descoberto por NELSON, et al (1965). Este gene é o "Floury 2" que produz uma concentração de lisina aproximadamente igual à do "Opaco 2" e a concentração de metionina é mais alta do que a produzida por qualquer outro gene testado.

Mais recentemente, AGRICULTURAL RESEARCH (1971) cita que Wolf e Khoo descobriram, na raça de milho Coroico, um novo tipo variante onde a aleurona é formada por várias camadas de células, ao invés de uma só camada como normalmente é encontrada nas populações de milho. Foi verificado, por análises químicas, que o teor proteico do milho Coroico é bem maior que o do milho normal.

Como a aleurona é uma parte do endosperma muito rica em proteínas, foi de interesse estudar alguns aspectos ligados a ela que podem se constituir em informações básicas para o início de um programa de melhoramento do teor proteico, através da própria camada de aleurona.

Mais especificamente são estudadas: 1- O comprimento, largura, espessura, área e volume das células de camadas de aleurona simples e múltiplas. O Conhecimento destas características pode ser importante como base para que outros trabalhos futuros sejam desenvolvidos com a finalidade de se estabelecer correlações entre morfologia da célula e teores

de proteína e aminoácidos.

2- Estudo da frequência do caráter aleurona múltipla em diferentes variedades, com o objetivo de se verificar a ocorrência de camadas múltiplas, ou tendência à multiplicidade.

3- Estudo de correlações entre dimensões do grão e das células de aleurona, para se averiguar se a morfologia do grão poderia ser usada como critério de seleção para a camada de aleurona.

2 . REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. Estrutura do grão e localização da camada de aleurona

WOLF, et al (1952a) analisaram a anatomia do grão do milho e demonstraram o relacionamento estrutural entre as suas partes componentes. Segundo os autores, o grão é um fruto tipo cariopsis e está dividido basicamente em 2 partes: pericarpo e semente.

O pericarpo é a camada mais externa e envolve a semente, exceto na pequena região da extremidade basal do grão onde existe um tecido de cobertura denominado de "tip cap" que é contínuo com o tecido do pericarpo. A semente é constituída pelo integumento, endosperma e embrião.

O integumento situa-se logo abaixo do pericarpo e envolve o endosperma e o germe. Na parte basal do grão, o integumento inexistente, mas em continuação a ele, existe a "hilar layer" que o complementa na função de cobertura do endosperma e germe.

Abaixo do integumento, situa-se o endosperma com a sua parte mais externa, a camada de aleurona, e sua parte interna, o parênquima de armazenamento de amido.

O integumento está localizado entre o pericarpo e a camada de aleurona; no grão maduro do milho, porém, ele é degenerado e se apresenta como uma membrana hialina tão fina que não pode ser vista com pequenos aumentos. Portanto, vista ao microscópio, a camada de aleurona e o pericarpo apresentam-se justapostos e unidos.

A camada de aleurona forma uma cobertura que envolve o endosperma amiláceo e o germe, e só é interrompida na base do grão, na região da "hilar layer". Nesta pequena região, existem células parenquimatosas, estruturalmente diferentes das células de aleurona às quais dão continuação servindo de camada marginal do endosperma.

2.2. Estrutura da camada de aleurona

Conforme WOLF, et al (1952b) a camada de aleurona apresenta usualmente células com 4 a 6 faces e frequentemente irregulares em forma.

Os resultados de mensurações feitas em diferentes regiões do grão de um híbrido dentado, mostraram que as células variam em dimensões de acordo com a região, ou seja, existe uma tendência regionalizada para a espessura da camada. Houve uma variação muito grande em micras, entre diferen-

tes regiões. As células de lamela média a lamela média, variaram de 24 a 64 u de comprimento e de 13 a 45 u de largura. As paredes das células apresentavam de 4,0 a 6,4 u de espessura. Quando observadas em cortes longitudinais ou transversais, as paredes externas das células são consideravelmente mais grossas que as paredes internas.

A camada de aleurona é relativamente espessa no dorso, lados e no topo frontal do endosperma, com valores médios de 47, 51 e 44 u respectivamente e consideravelmente mais fina na região do dente (corôa) com 32 u. Sobre o germe, a camada é bem mais fina ainda, tendo 12 u ao nível do 1º internódio e 20 u ao longo das margens laterais do escutelo.

O conteúdo das células de aleurona é granular em aparência porque cada célula é cheia de grãos esféricos de aleurona. O núcleo é visível no material corada. Não existem grânulos farináceos nas células de aleurona.

SAWICKI (1954) analisou em 103 variedades de cevada, o número de fileiras de células na camada de aleurona, a espessura da camada e a variabilidade desses caracteres. As variedades examinadas mostraram diferenças distintas com relação a ambas características estudadas. O número médio de fileiras de células das diferentes variedades variou de 1,64 a 3,11 e a espessura média da camada de aleurona variou de 49,94 a 110,16 u. Os estudos das duas características por vários anos e em diferentes condições climáticas, revelaram que elas exibem uma variabilidade pequena por influência do meio

ambiente. O autor afirma que a constância dos caracteres estudados permite que eles possam ser utilizados para a classificação de variedades de cevada.

Até 1970 sô se conhecia milhos com apenas uma camada de aleurona. Conforme AGRICULTURAL RESEARCH (1971) Wolfe e Khoo foram os descobridores da existência de camadas múltiplas no milho primitivo Coroico. As células se superpõem para formar 2,3,4 ou mais camadas. As 50 amostras do coroico analisadas pelo autor apresentaram, em média, 3,7 camadas de células.

BLUMENSCHHEIN (1973) coletou e analisou amostras de diversas regiões do Brasil e países sulamericanos e detectou 5 fontes de milhos com várias camadas, as quais estão localizadas no Acre, Amazonas, Roraima, Ceará e Paraguai.

2.3. Peso da camada de aleurona em relação ao grão

Pelos dados de HINTON (1953), a camada de aleurona de um milho flint constitui 2,2% do peso total do grão, o endosperma amiláceo 79,6%, o embrião 1,1%, o escutelo 10,6% e o pericarpo 6,5%. No trigo, a camada de aleurona foi observada ser mais desenvolvida que no milho, representando 7,0% do grão.

Conforme WOLF et al (1972), a camada simples de aleurona do milho comum constitui apenas 2,0% ou menos do peso total do grão, enquanto que no milho Coroico, a camada múltipla de aleurona representa 3,4%.

2.4. Composição da camada de aleurona com relação a aminoácidos, vitaminas e proteína

TEAS (1952) afirma que o maior teor de niacina existente nas sementes de milho que contem o gene "sugary" (su), deve-se ao aumento da espessura da camada de aleurona, como efeito pleiotrópico do próprio gene. As mensurações mostraram que as sementes "sugary" têm a aleurona 1,4 vezes mais espessa do que a das sementes normais.

As análises químicas revelaram que a aleurona detem 60 a 70 % da niacina da semente e que 89 a 94% da niacina extra encontrada nas sementes "sugary" está localizada na camada de aleurona. O aumento de niacina na aleurona não foi devido a um aumento de concentração, mais sim ao aumento da aleurona no "sugary", que pesa 1,98 vezes mais do que a aleurona das sementes normais.

HINTON et al (1953), analisaram as diversas partes do grão do trigo quanto ao conteúdo de vitaminas B. As vitaminas estudadas foram: riboflavina e ácido pantotênico. Os resultados dos teores encontrados são apresentados no quadro I, conjuntamente com os teores de mais 2 vitaminas - a aneurina e o ac. nicotínico, previamente determinados por outros autores.

QUADRO I - Teores de vitaminas B nas diferentes frações do trigo

Percentagem em relação ao grão

Fração	Ac.		Ac.	
	Aneurina	Nicotinico	Riboflavina	Pantotenico
Pericarpo + Testa	1	4	5	8
Aleurona	31	84	37	39
Embrião	2	1	12	3,5
Escutelo	62,5	1	14	4
Endosperma	3	11,5	32	41

Os resultados demonstraram que existe uma concentração relativamente alta de todas as 4 vitaminas na aleurona. Os autores acreditam que a camada de aleurona dos cereais é a mais rica fonte natural das vitaminas B e mencionam também que estudos desenvolvidos com enzimas (phytase, proteí nase, dipeptidase e esterase), demonstraram que estas enzi mas têm grande atividade na camada de aleurona.

Outro aspecto que julgam de interesse, é que a aleurona tem um maior conteúdo de cinza e, conseqüentemente, um maior conteúdo mineral do que o de qualquer outra fração do grão do trigo.

HINTON (1953) estudou a distribuição de proteí na entre 7 regiões anatômicas de um milho flint e do trigo e

concluiu que 70% da proteína total está localizada no endosperma e que a distribuição da proteína no milho se assemelha à do trigo, exceto que, no milho, a camada de aleurona, por ser proporcionalmente menor, contém menor percentagem da proteína total e o escutelo, por ser maior, assume um maior percentual. Os dados obtidos estão no quadro II.

QUADRO II - Distribuição percentual da proteína bruta no milho e trigo.

Regiões	Proporção da semente		Teor proteico		Proporção em relação à proteína total	
	milho	trigo	milho	trigo	milho	trigo
C.aleurona	2,2	7	19,2	19,7	2,2	4
Endosperma 1	3,9	12,5	27,7	13,7	11,9	19,4
Endosperma 2	58,1	12,5	7,5	8,8	48,2	12,4
Endosperma 3	17,6	57,5	5,6	6,2	10,9	40,7
Embrião	1,1	1	26,5	33,3	3,2	3,5
Escutelo	10,6	1,5	16	26,7	18,9	4,5
Pericarpo	6,5	8	3	4,4	2,2	4,

RICHEY e DAMSON (1954) são de opinião que o mais alto conteúdo de niacina no milho "sugary" em relação ao normal, necessita mais de uma explicação fisiológica do que morfológica. Eles se baseiam no fato de que cada parte da semente "sugary" tem mais niacina por unidade de peso, do que as partes correspondentes da semente do milho normal. O alto conteúdo de niacina é atribuído pelos autores como consequên-

cia de uma interação pleiotrôpica do gene (su) com um sistema de fatores múltiplos.

STEVENS, et al (1963) isolaram do trigo, a proteína das células de aleurona e do resto de endosperma e determinaram a composição de aminoácidos para ambos. Com relação à composição de aminoácidos, a proteína da aleurona se assemelhou a algumas frações de proteína solúvel isoladas da farinha do endosperma. A proteína da aleurona apresentou um conteúdo de arginina bem mais alto do que a proteína do endosperma e regulamente mais alto também em lisina, histidina e ac. aspártico. As frações isoladas não incluem a parede celular, a qual era despezada.

AGRICULTURA DE LAS AMERICAS (1972) afirma que a sobreposição das células de aleurona, formando camadas múltiplas, confere uma maior espessura à camada de aleurona do milho coróico. Conforme o autor a aleurona é a parte do grão que contém a vitamina B e proteína de alta qualidade, além de uma concentração proteica maior do que a das demais partes do grão. Portanto, qualquer aumento da aleurona, provoca um aumento de proteína. Assim, a quantidade de proteína do milho coróico é quase o dobro da do milho comum. CONFORME WOLF et al (1972) a aleurona múltipla ocorre em grãos de cereais como cevada, aveia e certas variedades de arroz. Os autores vêem na descoberta do milho com aleurona múltipla, uma importância muito grande, principalmente porque existe a possibilidade, através de seleção, de se aumentar a camada de aleurona, reduzindo proporcionalmente o endosperma amiláceo, com a finalidade

de de se aumentar o teor proteico, melhorar a qualidade da proteína e se conseguir uma maior concentração de vitaminas. A quantidade de proteína, na aleurona, é maior no milho coróico do que no milho comum, não somente pelo fato da aleurona do coróico ser mais volumosa, mas também porque o seu teor proteico é maior.

No milho coróico com uma média de 3,7 camadas de células, 17% da proteína total do endosperma está localizada na camada de aleurona, comparada com somente 7% no milho comum. A concentração de lisina no endosperma do coróico foi observada ser cerca de 3 vezes mais alta do que no milho dente comum. No milho coróico com 3,7 camadas, a aleurona representa 4,3% do endosperma, enquanto que no milho dente comum, representa apenas 2,1%.

3 . MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos feitos estão divididos em 3 partes distintas que são: (1) - estudo das dimensões das células (comprimento, largura, espessura, área e volume) de camadas de aleurona simples e múltiplas; (2) - estudo da frequência de aleurona múltipla em diferentes variedades; (3) - estudo de correlações entre as dimensões do grão e das células de aleurona.

3.1. Estudo das dimensões das células

As dimensões das células foram estudadas sob 2 aspectos: um deles, estabelece estimativas das dimensões para todo o grão do milho e o outro para apenas uma pequena região do grão.

3.1.1. Estimativa para todo o grão

Para este estudo foram utilizadas 7 variedades, representando diferentes tipos de milhos de diversas procedências.

3.1.1.1. Variedades utilizadas, suas origens e tipos

<u>Variedades</u>	<u>Origem</u>	<u>Tipo</u>
Cearã 147	Mun. de Senador Pompeu - Ceará	Floury
Opaco 2	México e Brasil	Floury
Centralmex	A. Central e México	Meio dente
Composto	Instituto Genética - Piracicaba	Meio dente
Bolívia I	Bolívia	Floury
Bolívia II	Bolívia	Floury (Coroico)
Paraguai V	Paraguai	Floury (Coroico)

De cada variedade foram analisados 30 grãos. Com exceção de Bolívia II e Paraguai V, os 30 grãos provieram de diferentes espigas de polinização livre. Para Bolívia II os 30 grãos são oriundos de 3 espigas S_1 e para Paraguai V, de uma espiga S_1 .

3.1.1.2. Técnicas citológicas empregadas

Para obtenção e preparação dos cortes: De cada grão de milho foram obtidos 3 cortes longitudinais e 3 cortes transversais com 30 micras de espessura. O grão era fixado ao micrótomo através de 2 bloquinhos de madeira contendo recortes aproximadamente no mesmo formato do mesmo. Assim, o grão a ser cortado ficava prensado entre os 2 bloquinhos, deixando livre somente a parte da qual se queria obter os cortes. Em primeiro lugar eram obtidos os cortes longitudinais. Para isso, regulava-se o ângulo de corte e rodava-se o micrótomo de

modo que o grão fosse desgastado até o ponto estabelecido para a obtenção dos mesmos. Chegando nesse ponto parava-se o micrôtom e, em seguida, umedecia-se a superfície a ser cortada com um pequeno pincel previamente imerso na água*. Era necessário esperar de 10 a 15 segundos, para que a água penetrasse no tecido de modo a permitir a obtenção de bons cortes. A função da água é dar maior coesão às partículas de amido do endosperma, evitando que elas se desagregem pelo atrito com a lâmina do micrôtom.

Era sempre aproveitado um corte e despresados dois subsequentes. Este procedimento para se obter cortes salteados, evita que os mesmos tenham a estrutura celular semelhante, permitindo, melhores amostragens e estimativas. Era necessário o umedecimento da superfície a ser cortada, com um pincel, antes dos cortes aproveitáveis, mas não na dos não aproveitáveis.

Após a obtenção dos cortes longitudinais, o grão era retirado, preso em outros 2 bloquinhos e colocado novamente no micrôtom para se fazer os cortes transversais. A metodologia usada foi semelhante à descrita para a obtenção dos cortes longitudinais.

*Esta técnica para a obtenção dos cortes foi criada pelo laboratorista de citologia do Inst. de Genética, Leslie Sbrissa.

Os cortes longitudinais tangenciam lateralmente o embrião e os transversais tangenciam a extremidade superior do embrião. Ambos os cortes são mostrados na fig. 1; eles formam entre si um ângulo de 90° . As posições escolhidas para os cortes são as que abrangem menos tecidos curvo ou enrugado e a maior quantidade de células disponíveis para a análise. A curvatura e o enrugamento do pericarpo e da camada de aleurona alteram o ângulo formado entre o plano de corte e as células, resultando em distorções que prejudicam as mensurações a serem feitas com o microscópio. As partes curvas dos cortes foram desprezadas como podem ser vistas na fig. 1.

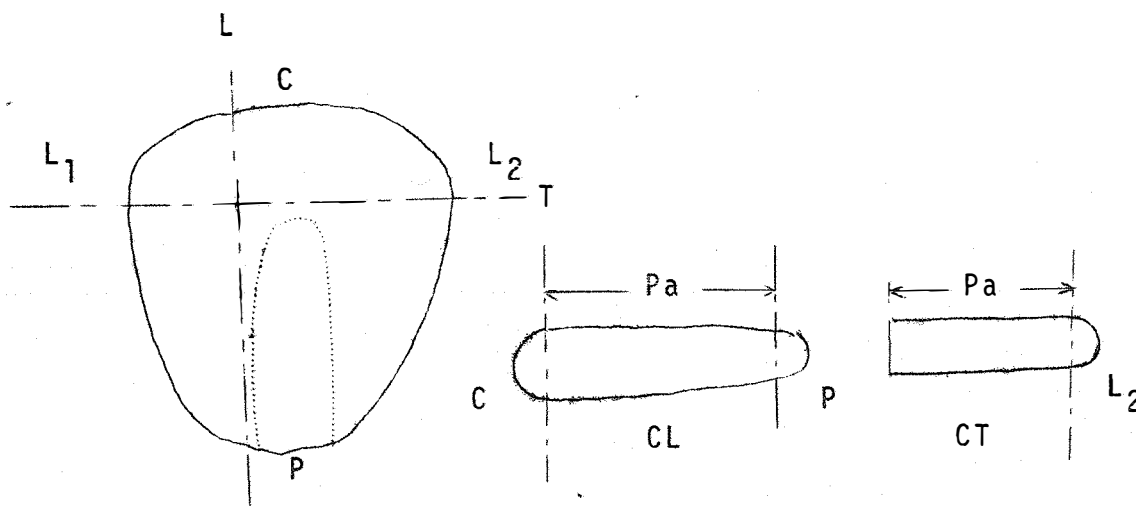


Figura 1 - Posições dos cortes longitudinais (L) e transversais (T). CL - corte longitudinal visto de frente, com as partes desprezadas da curvatura da coroa (C) e da curvatura da ponta do grão (P); CT - corte transversal visto de frente com a parte desprezada da curvatura lateral (L_2); Pa - parte analisada.

Os grãos de milho foram cortados com um microtomo "Spencer" e os cortes a medida que iam sendo obtidos eram

colocados em placas de petri contendo água. Cada placa era etiquetada segundo o número do grão e o tipo de corte se transversal ou longitudinal.

Para se fazer a coloração, os cortes eram retirados das placas de petri com um estilete e colocados dentro de pequenos recipientes contendo uma solução corante (Bismark brown), onde permaneciam durante 5 minutos. Este tempo de permanência no corante era suficiente para promover uma boa diferenciação entre as células de aleurona, o resto do endosperma e o pericarpo. Após os 5 minutos, os cortes eram recolocados nas placas de petri para que o excesso de corante fosse removido pela água. Decorridos aproximadamente 10 minutos, tempo em que o excesso de corante já tinha sido removido, os cortes eram montados em lâminas provisórias (montagem em água) e analisados ao microscópio dentro de um período de 24 horas; após a análise, as lâminas eram jogadas fora.

O endosperma assumia uma coloração acinzentada, com algumas regiões mais claras e outras mais escuras. As paredes das células de aleurona apresentavam uma cor amarelada, os centros brancos, quando o núcleo era eliminado durante o corte, e escuro se o núcleo estivesse presente. O pericarpo corava-se mais intensamente que as paredes das células de aleurona, assumindo uma cor alaranjada. Entre o pericarpo e as células de aleurona evidencia-se uma linha divisória escura, provavelmente formada pelo integumento corado.

Para cada grão eram montadas 2 lâminas: uma contendo 3 cortes longitudinais e a outra 3 cortes transversais.

Para análise da camada de aleurona

Dos 3 cortes de cada lâmina, apenas 2 eram analisados ao microscópio, ficando o terceiro como uma opção a mais para a escolha no momento da análise e mesmo como garantia em caso de haver dano em um dos cortes.

Nos cortes longitudinais, media-se com a ocular micrométrica do microscópio o comprimento e nos transversais a largura e a espessura das células de aleurona. A fig. 2 mostra como se dispõem as referidas dimensões.

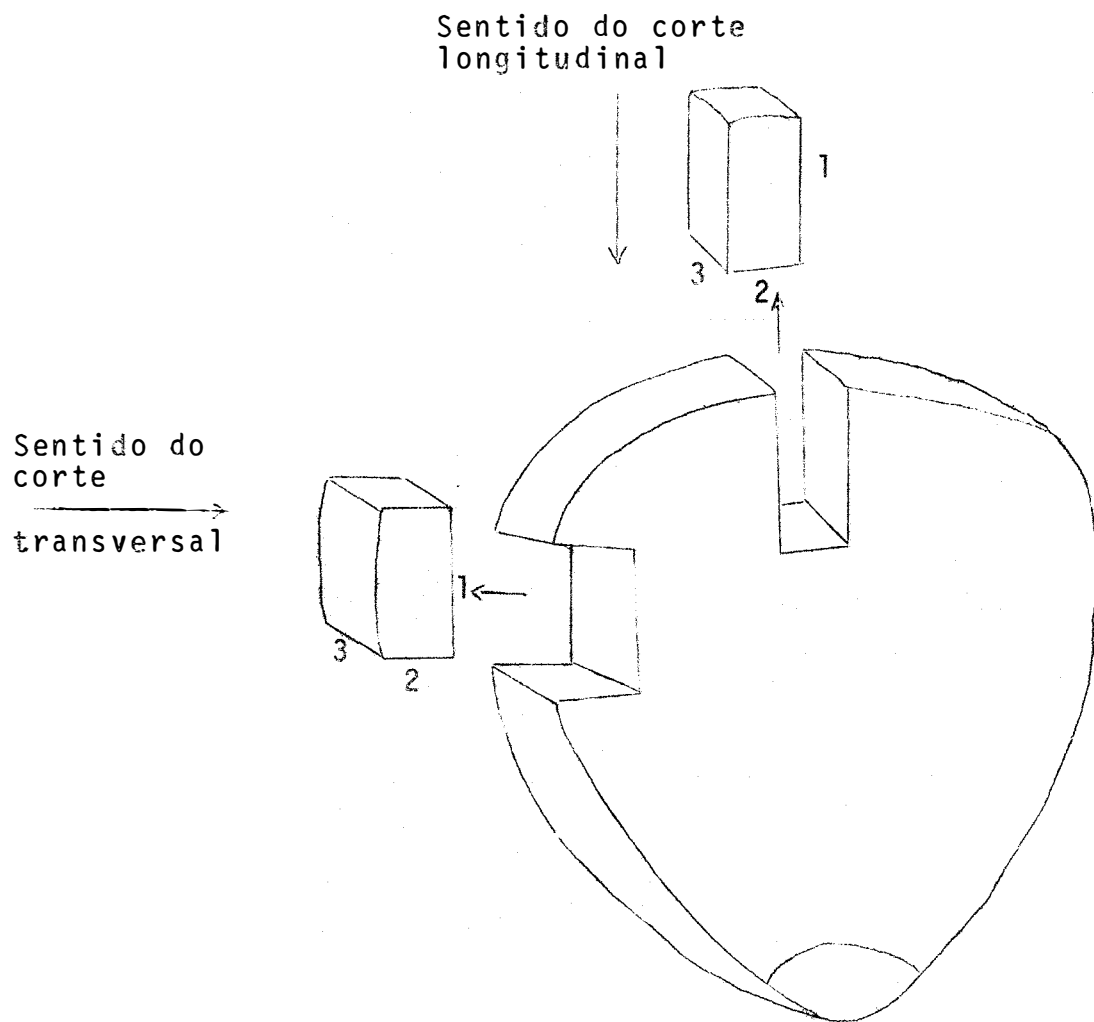


Fig. 2 - Disposição da célula em relação ao grão, mostrando o comprimento, largura e espessura; 1 - comprimento; 2 - largura; 3 - espessura.

Para cada corte foram feitas de 6 a 10 mensurações. Como de cada grão foram analisados 2 cortes longitudinais e 2 transversais, obteve-se por grão, 12 a 20 dados para comprimento das células, 12 a 20 dados para largura e 12 a 20 dados para espessura. A variação do número de mensurações feitas para os diferentes grãos é devido à própria variação do tamanho do grão; quanto maior era o grão, maior número de mensurações era necessário para conservar uma boa amostragem de células por grão.

WOLF et al (1969) estudaram a espessura do pericarpo do milho em diferentes populações e concluíram que, no mínimo, 6 mensurações por grão deveriam ser feitas para que se obtivesse uma boa estimativa.

HELM & ZUBER (1969) estudaram a variação da espessura do pericarpo de linhas puras de milho dente, utilizando 6 mensurações por grãos.

Portanto, as 12 a 20 mensurações tomadas por cada parâmetro e por grão parecem ser suficientes para estimar os parâmetros, comprimento, largura e espessura das células de aleurona.

As mensurações eram feitas em volta de todo o corte, com exceção das partes curvas que nos cortes longitudinais correspondem às curvas da coroa e da ponta do grão e nos transversais à curvatura lateral do grão, como está demonstrado na fig. 1. Nas partes em que o tecido é curvo ou enrugado, ocorre, muitas vezes, distorções nas células, resultando em

alterações do ângulo de corte, que poderiam prejudicar a obtenção de boas estimativas. Portanto, parece mais recomendável que tais partes sejam desprezadas.

Cada mensuração do comprimento ou da largura, não era feita por célula individualmente. Media-se um conjunto de células de uma só vez o qual corresponde ao número de células encontrado dentro do campo graduado da ocular micrométrica, que é variável segundo as dimensões das células. Portanto, medindo-se muitas células de uma só vez e dividindo-se o valor encontrado pelo número de células correspondente a esse valor, obtínhamos a dimensão média das células para cada conjunto. Acreditamos que este procedimento permite uma estimativa mais precisa dos parâmetros estudados, do que se as mensurações fossem feitas por cada célula individualmente. A amostragem no primeiro caso é bem maior que no segundo, para uma mesma unidade de tempo gasto. Se, por exemplo, num determinado grão fossem feitas 20 mensurações, seriam realmente medidos 20 conjuntos de células e as suas médias utilizadas como dados para a análise estatística.

Dentro de cada conjunto, nos cortes transversais, media-se também a espessura da camada de aleurona, bastando para isso, girar a ocular micrométrica, após a mensuração da largura. Geralmente, apenas uma mensuração era necessária para se determinar a espessura dentro de cada conjunto, porque num conjunto de 5 a 15 células, a espessura praticamente não varia. Quando alguma variação era notada dentro do conjunto, faziam-se 2, 3 ou mais mensurações e calculava-se a

espessura média dessas mensurações.

Por outro lado, observa-se uma variação acentuada entre diferentes conjuntos ou entre diferentes regiões do grão.

Nas duas variedades de aleurona múltipla (Paraguai V e Bolívia II) as mesmas mensurações que eram feitas para a 1ª camada, eram também feitas para a 2ª camada, e o procedimento usado foi o mesmo.

3.1.2. Estimativa para uma pequena região do grão

Foram utilizadas para este estudo, 7 variedades, sendo que 5 delas foram iguais às utilizadas para o estudo de estimativa para todo o grão.

3.1.2.1. Variedades utilizadas, suas origens e tipos

As 5 variedades em comum com as utilizadas no estudo da estimativa para todo o grão são: Ceará 147, Opaco 2, Centralmex, Bolívia II e Paraguai V. Suas origens e tipos já estão descritas no item 3.1.1.1. As duas variedades diferentes são:

<u>Variedades</u>	<u>Origem</u>	<u>Tipo</u>
Acre	Acre	Flint
Flint Composto	Inst. Genética Piracicaba	Flint

De cada variedade foram analisados 20 grãos.

3.1.2.2. Técnicas citológicas empregadas

A metodologia seguida foi a mesma descrita no ítem 3.1.1.2., com as pequenas diferenças seguintes:

Para obtenção e preparação dos cortes: Os planos de corte passavam no mesmo sentido, porém, mais profundos, de modo a atingirem levemente o embrião. O seccionamento do embrião era necessário, para que se pudesse 'distinguir ao microscópio, o lado do corte correspondente ao germe do lado oposto ao mesmo, para então se ter condições de caracterizar a região alvo para as mensurações. Ver fig. 3.

Para cada grão foram preparadas 2 lâminas: uma contendo 2 cortes longitudinais e a outra 2 transversais; contudo, somente um corte de cada lâmina era analisado, servindo o segundo como uma opção a mais para a escolha do corte mais nítido ao microscópio e como margem de segurança para algum caso de dano em um dos cortes. Apenas um corte era analisado porque pretendiam-se, somente, dados de 10 células, individualmente.

Para análise da camada de aleurona

As mensurações foram tomadas de uma pequena região situada na metade superior do eixo longitudinal do grão e do lado oposto ao germe, conforme a Fig. 3.

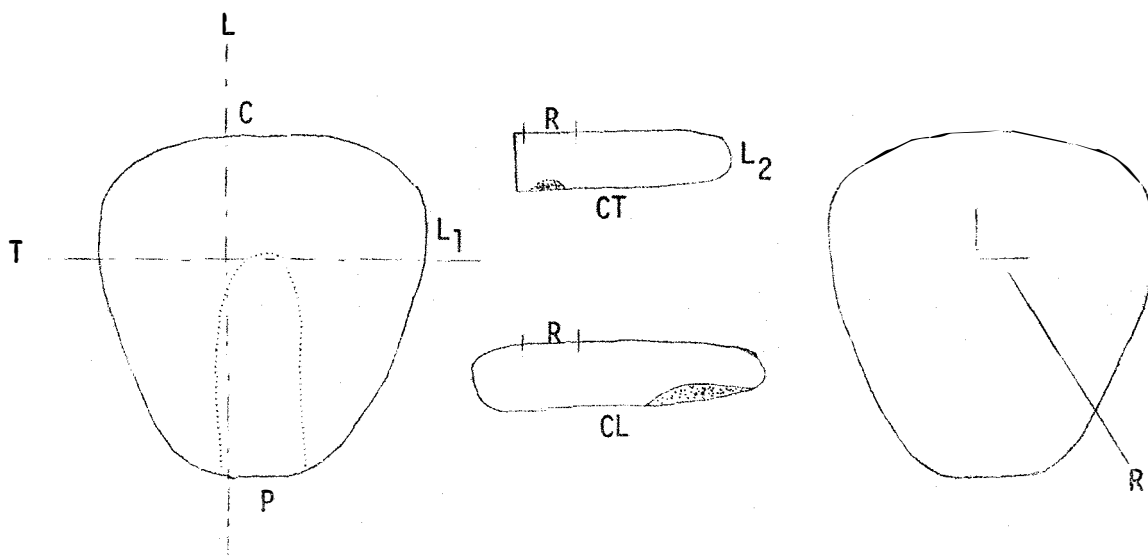


Fig. 3 - Posições dos cortes longitudinais (L) e transversais (T); CL - Corte longitudinal visto de frente; CT - Corte transversal visto de frente; R - Região analisada

Nos cortes longitudinais e dentro da pequena região estipulada (R, fig. 3), 10 células eram medidas individualmente quanto ao comprimento e nos transversais outras 10 células eram medidas quanto à largura e espessura (R, fig. 3). Como vimos, para este estudo, as mensurações foram feitas em cada célula individualmente e não mais em conjuntos de células, pelo motivo de se pretender estimar os parâmetros em apenas uma pequena região do grão, para se verificar se existe muita diferença entre os parâmetros dos diferentes grãos, dentro desta região predeterminada.

3.2. Estudo da frequência de aleurona múltipla em diferentes variedades

Cinco variedades foram examinadas: Ceará 147, Opaco 2, Acre, Bolívia I e Paraguai V. Todos os grãos utili-

zados foram provenientes de espigas de polinização aberta.

Cem grãos de cada variedade foram cortados e analisados ao microscópio. Os cortes foram obtidos, corados e preparados pela mesma maneira já descrita, só que se trabalhou apenas com cortes longitudinais, em virtude deles abran-gerem maior perímetro do grão que os transversais.

De cada grão, foi preparada uma lâmina com 2 cortes longitudinais que era levada ao microscópio, mas nenhuma mensuração era feita; examinava-se apenas a camada de aleu-rona e anotava-se se ela era simples, simples com tendência a duplicação, dupla, dupla com tendência a triplicação, tripla ou com mais camadas. Desse modo pôde-se fazer uma avaliação da frequência dos grãos com camadas múltiplas de aleurona, den-tro de cada variedade.

3.3. Estudo de correlação entre as dimensões do grão e das células de aleurona

Os mesmos grãos utilizados para estimar as di-mensões das células (item 3.1.1.) eram medidos antes de serem cortados. De cada grão, media-se com um paquímetro o seu com-primento, largura e espessura e os valores encontrados foram estudados quanto à existência de possíveis correlações com os valores tomados das células de aleurona. As correlações estu-dadas foram as seguintes: comprimento do grão x comprimento das células; largura do grão x largura das células; volume do grão x volume das células; relação comprimento/largura do grão x espessura das células.

As leituras feitas com o paquímetro, tiveram uma aproximação até centésimos de centímetro.

3.4. Metodologia estatística

Os parâmetros estimados, tanto em relação à todo o grão como em relação a uma pequena região do grão, foram comparados estatisticamente pelo método de análise da "classificação hierárquica", descrito por Snedecor (1956). Este método é próprio para dados que compõem um sistema de sub-amostras dentro de amostras.

Para o estudo da correlação entre as dimensões do grão e das células de aleurona, os dados foram analisados pela fórmula convencional de correlação.

4. RESULTADOS

No texto são apresentados: 1 - em primeiro lugar os resultados relativos à estimativa para todo o grão; 2 - em segundo, os resultados referentes à estimativa para uma pequena região do grão. Para ambos os tipos de estudo, estão relacionadas as médias das variedades para cada um dos parâmetros estudados; os quadros das análises da variância são apresentados no apêndice; 3 - em seguida são expostas as frequências de aleurona múltipla nas diferentes variedades; 4 - por último são mostrados os coeficientes de correlação encontrados no estudo de correlação entre as dimensões do grão e das células de aleurona.

4.1. Estimativa para todo o grão

O quadro III apresenta as variedades classificadas segundo as dimensões: comprimento da 1ª camada, largura da 1ª camada, espessura da 1ª camada, espessura da 2ª camada, espessura da 1ª + 2ª camada, área da 1ª camada, área da 2ª camada, área média entre a 1ª e 2ª camadas, volume da 1ª camada, volume da 2ª camada, volume médio entre a 1ª e 2ª camadas.

As médias das variedades são apresentadas no texto e são diferentes estatisticamente entre si, aquelas que não estiverem unidas por um traço vertical.

QUADRO III - Classificação das variedades em ordem decrescente, segundo as médias dos parâmetros estudados

Variedades	Comprimento	Largura	Espessura 1º	Espessura 2º	Espessura 1º + 2º	Área 1º	Área 2º	Área $\frac{1º + 2º}{2}$	Volume 1º	Volume 2º	Volume $\frac{1º + 2º}{2}$
Paraguai V	1	2	5	1	1	1	1	1	1	1	1
Bolívia II	5	1	4	2	2	2	2	2	2	2	4
Ceará 147	2	4	1	-	3	4	-	4	3	-	2
Opaco 2	4	3	3	-	5	3	-	3	4	-	3
Centralmex	6	6	6	-	6	6	-	6	7	-	7
Bolívia I	7	7	2	-	4	7	-	7	6	-	6
Composto	3	5	7	-	7	5	-	5	5	-	5

Observação: o ordinal 1º refere-se à primeira camada e o ordinal 2º à segunda camada.

Com base na classificação do quadro III, podemos verificar que as variedades do tipo floury (endosperma farináceo), apresentaram células com maiores dimensões que as variedades de endosperma não farináceo. Assim, as variedades Paraguai V, Bolívia II, Ceará 147 e Opaco 2 que são caracteristicamente do tipo floury, possuem células de aleurona com maiores áreas e volumes que as variedades Centralmex e composto.

A classificação do quadro III, também fornece indicação de que as variedades com aleurona múltipla possuem células com maiores dimensões que as de aleurona simples.

4.1.1. Comprimento e largura das células

O comprimento e a largura das células variam bastante entre os diferentes grãos e variedades, como pode ser visto nos quadros XXXVI a XLII do apêndice e nas médias das variedades apresentadas no quadro IV.

QUADRO IV - Médias das variedades para comprimento e largura das células, em micras

Comprimento		Largura	
Paraguai V	45,54	Bolívia II	32,00
Ceará 147	43,75	Paraguai V	31,81
Composto	43,55	Opaco 2	28,15
Opaco 2	43,40	Ceará 147	27,27
Bolívia II	41,69	Composto	26,68
Centralmex	39,95	Centralmex	26,23
Bolívia I	36,03	Bolívia I	25,18

As análises da variância demonstraram existir contrastes significativos ao nível de 1% de probabilidade entre as variedades e entre grãos dentro de cada variedade, tanto para comprimento como para largura.

Observa-se que as médias para comprimento são maiores que as médias para largura. Isto indica que as células de aleurona dispõem-se no grão do milho de maneira que as suas maiores dimensões, os comprimentos, têm o mesmo sentido do eixo longitudinal do grão, e as menores, as larguras, acompanham o sentido do eixo transversal. Esta inferência também é válida para as células da 2ª camada.

Comparando-se os comprimentos médios com as larguras, verifica-se que algumas variedades apresentam células mais bem proporcionadas, isto é, com menores diferenças entre comprimento e largura, enquanto que em outras, as células são mais alongadas e portanto apresentando maiores diferenças entre comprimento e largura. As variedades com aleurona múltipla ou com tendência à duplicação, Bolívia II, Paraguai V, Bolívia I e Centralmex, apresentaram células mais bem proporcionadas, enquanto que em Ceará 147 e composto, variedades que não mostraram tendência à duplicação, as células assumem uma forma mais alongada.

4.1.2. Espessura das células

A espessura média da 1ª camada das 2 variedades de aleurona múltipla (Paraguai V e Bolívia II) foi menor

que a espessura média de 3 variedades de aleurona simples (Cea
rã 147, Bolívia I e Opaco 2), apesar de não haver inferioridad
de estatística. As outras duas variedades de aleurona simp
les (Centralmex e Composto) tiveram as médias mais baixas,
sendo que a variedade Composto so se igualou estatisticamente
ã variedade Centralmex e foi inferior às demais (quadro V).

Quando se considera o tecido total de aleuron
a, ou seja, a soma da 1ª camada mais a 2ª camada, as variadad
es de aleurona múltipla passam a assumir uma posição de dest
aque, por apresentarem a espessura total da camada de aleuron
a, nitidamente superior à espessura da camada das variedades
de aleurona simples (quadro V). Isto demonstra que a maior
espessura do tecido de aleurona, nas 2 variedades de aleurona
múltipla, em relação as de aleurona simples, deve-se à exist
tência de mais de uma camada de células e não ao aumento da
espessura de cada camada por si.

QUADRO V - Médias das variedades para espessura das células em micras.

Espessura - 1ª		Espessura - 1ª + 2ª	
Ceará 147	47,52	Paraguai V	73,10
Bolívia I	45,97	Bolívia II	67,68
Opaco 2	44,94	Ceará 147	47,52
Bolívia II	43,80	Bolívia I	45,97
Paraguai V	43,51	Opaco 2	44,94
Centralmex	40,08	Centralmex	40,08
Composto	38,75	Composto	38,75

Espessura - 1ª versus 2ª

Paraguai V		Bolívia II	
1ª - 43,51	significativo (1%)	1ª - 42,65	sign. (1%)
2ª - 29,59		2ª - 23,88	

Observação: o valor da 1ª camada de B. II sofreu modificação, porque, para a comparação estatística entre a 1ª e 2ª camadas, 4 grãos não tinham dados suficientes e por isso foram desprezados.

Os resultados demonstram também que a espessura da 2ª camada do Paraguai V, é bem maior que a espessura da 2ª camada de Bolívia II. Assim, quando se considerou apenas a 1ª camada, as médias das duas variedades foram quase iguais e não diferiram estatisticamente; mas, quando se considerou a 1ª + 2ª, a variedade Paraguai V teve uma espessura bem superior e estatisticamente diferente da espessura da variedade Bo-

A espessura das células da 2ª camada é significativamente inferior ao nível de 1%, à espessura das células da primeira camada, tanto para Paraguai V, como para Bolívia II (quadro V).

4.1.3. Área das células

A análise da variância, demonstra haver significância para a área da 1ª camada, ao nível de 1%. Não foi possível testar estatisticamente se houve diferenças entre os grãos dentro de variedades, pelo motivo de não se dispor dos dados "dentro do grão", para área. Mas, o fato de existir bastante variação da área entre os diferentes grãos, como pode ser observado nas tabelas do apêndice, leva-nos a crer que, provavelmente, existam diferenças estatísticas entre eles.

As médias das variedades apresentadas no quadro VI, mostram que as variedades caracterizadamente do tipo farináceo, tiveram as maiores médias e dentre elas destacam-se as de aleurona múltipla.

QUADRO VI - Médias das variedades para área das células, em micras

Área - 1ª		Área $\frac{1ª + 2ª}{2}$	
Paraguai V	1450,75	Paraguai V	1595,06
Bolívia II	1338,07	Bolívia II	1471,89
Opaco 2	1223,74	Opaco 2	1223,74
Ceará 147	1198,98	Ceará 147	1198,98
Composto	1163,78	Composto	1163,78
Centralmex	1044,51	Centralmex	1044,51
Bolívia I	917,87	Bolívia I	917,87

Área - 1ª versus 2ª

<u>Paraguai V</u>		<u>Bolívia II</u>	
1ª - 1448,25	significativo (1%)	1ª - 1358,69	significativo (1%)
2ª - 1741,87		2ª - 1585,09	

Observação: para a análise estatística da área da 1ª versus 2ª, 5 grãos da Bolívia II e 1 grãos de Paraguai V foram desprezados por não terem número de dados julgados suficiente. Consequentemente, houve pequenas alterações nas médias da 1ª camada das duas variedades.

Quando se considera a área média entre a 1ª e 2ª camadas, as variedades de aleurona múltipla, Paraguai V e Bolívia II, apresentam valores ainda mais altos e consequentemente se distanciam mais das outras variedades (Quadro VI). Como pode ser visto, as áreas das células da 2ª camada foram

significativamente maiores ao nível de 1% do que as áreas das células da 1ª camada, para ambas as variedades de aleurona múltipla.

4.1.4. Volume das células

A análise da variância para volume das células da 1ª camada, indica que existem contrastes significativos entre as variedades, ao nível de 1%. Não foi possível testar estatisticamente se houve contrastes significativos entre os grãos, pelos mesmos motivos expostos para área, no ítem 4.1.3.

Considerando o volume da 1ª camada, nota - se uma nítida tendência das variedades do tipo "floury" a apresentarem maiores médias (Quadro VII).

QUADRO VII - Médias das variedades para volume das células em micras

Paraguai V	63111,34	Paraguai V	57211,25
Bolívia II	57958,38	Ceará 147	56925,81
Ceará 147	56925,81	Opaco 2	55467,40
Opaco 2	55467,40	Bolívia II	47432,32
Composto	44698,16	Composto	44698,16
Bolívia I	42216,37	Bolívia I	42216,37
Centralmex	41658,24	Centralmex	41658,24

Volume - 1ª versus 2ª

<u>Paraguai V</u>		<u>Bolívia II</u>	
1ª - 63185,05	sig. (1%)	1ª - 57478,61	sig. (1%)
2ª - 51237,45		2ª - 37386,03	

Observação: para a análise estatística do volume da 1ª versus 2ª, 5 grãos da Bolívia II e 1 grão de Paraguai V foram desprezados por não terem número de dados julgado suficiente. Consequentemente, houve pequenas alterações nas médias da 1ª camada das duas variedades.

O volume médio entre a 1ª e a 2ª camada foi menor que o volume da 1ª camada em ambas as variedades de aleurona múltipla, em consequência das células da 2ª camada terem menor volume do que as células da 1ª camada (Quadro VII). AS diferenças entre os volumes das células da 1ª e 2ª camadas foram significativos a 1%.

4.2. Estimativa para uma pequena região do grão

Tanto os parâmetros estudados como os procedimentos estatísticos, foram os mesmos envolvidos no estudo da estimativa para todo o grão (item 4.1.), com a diferença, que as estimativas são específicas para uma pequena região do grão, preestabelecida. Por esta razão, serão evitados esclarecimentos minuciosos já abordados no item 4.1.

O quadro VIII apresenta as variedades classificadas segundo as dimensões: comprimento da 1ª camada, largura da 1ª camada, espessura da 1ª camada, espessura da 2ª camada, espessura da 1ª + 2ª camadas, área da 2ª camada, área da 2ª camada, área média entre a 1ª e 2ª camadas, volume da 1ª camada, volume da 2ª camada, volume médio entre a 1ª e 2ª camadas.

Os dados da análise da variância estão expostos no apêndice, nos quadros XXV a XXXV.

As médias das variedades são apresentadas no texto e só diferem estatisticamente entre si, aquelas que não estiverem unidas por um traço vertical.

QUADRO VIII - Classificação das variedades em ordem decrescente, segundo as médias dos parâmetros estudados

Variedades	Comprimento	Largura	Espessura 1ª	Espessura 2ª	Espessura 1ª + 2ª	Área 1ª	Área 2ª	Área $\frac{1ª + 2ª}{2}$	Volume 1ª	Volume 2ª	Volume $\frac{1ª + 2ª}{2}$
Paraguai V	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bolívia II	2	2	4	2	2	2	2	2	2	2	3
Ceará 147	3	5	2	-	3	3	-	3	3	-	2
Opaco 2	5	6	3	-	4	6	-	6	4	-	4
Centralmex	7	4	6	-	6	5	-	5	5	-	5
Acre	6	7	5	-	5	7	-	7	6	-	6
Flint composto	4	3	7	-	7	4	-	4	7	-	7

Observação: o ordinal 1º refere-se à primeira camada e o ordinal 2º à segunda camada

Pela classificação do quadro VIII, observa-se mais uma vez que os milhos do tipo farináceo apresentaram células mais volumosas que os milhos do tipo duro ou meio dente. Confirma-se também a tendência dos milhos de aleurona múltipla a terem células de maiores dimensões.

4.2.1. Comprimento e largura das células

Tanto para comprimento como para largura, houve diferenças significativas entre as variedades e entre grãos dentro das variedades, ao nível de 1% de probabilidade (Quadro IX).

QUADRO IX - Médias das variedades para comprimento e largura das células, em micras

Comprimento		Largura	
Paraguai V	50,41	Paraguai V	30,97
Bolívia II	46,23	Bolívia II	29,78
Ceará 147	45,23	Flint Composto	28,60
Flint Composto	42,27	Centralmex	27,66
Opaco 2	39,33	Ceará 147	26,90
Acre	38,93	Opaco 2	26,74
Centralmex	38,32	Acre	26,04

4.2.2. Espessura das células

A espessura da 1ª camada de aleurona, na restrita região do grão onde foi medida, apresenta variações acen-

tuadas entre as diferentes variedades (Quadro X) e entre os diferentes grãos dentro das variedades.

As variedades de endosperma farináceo têm as maiores médias e dentre elas se destacam as de aleurona múltiplas, as quais passam a assumir uma posição de maior destaque ainda, quando se considera a espessura total da aleurona, ou seja, a soma da primeira camada mais a segunda (Quadro X).

QUADRO X - Médias das variedades para espessura das células, em micras

Espessura 1ª		Espessura 1ª + 2ª	
Paraguai V	60,80	Paraguai V	89,77
Ceará 147	55,60	Bolívia II	77,58
Opaco 2	54,57	Ceará 147	55,60
Bolívia II	51,80	Opaco 2	54,57
Acre	45,79	Acre	45,79
Centralmex	43,62	Centralmex	43,62
Flint Composto	31,47	Flint Composto	31,47

Espessura 1ª versus 2ª

Paraguai V		Bolívia II	
1ª - 60,80	significativo (1%)	1ª - 51,80	sig.(1%)
2ª - 32,73		2ª - 27,83	

Todas as comparações estatísticas foram significativas ao nível de 1%.

A segunda camada, tanto para Paraguai V como para Bolívia II, foi significativamente menos espessa que a primeira camada (Quadro X).

4.2.3. Área das células

A análise da variância acusou contrastes significativos entre as variedades ao nível de 1%. Nota-se pelas médias (Quadro XI), que as variedades de aleurona múltipla possuem células da primeira camada, com áreas maiores que das demais variedades.

QUADRO XI - Médias das variedades para área das células, em micras

Área 1ª		Área $\frac{1ª + 2ª}{2}$	
Paraguai V	1567,62	Paraguai V	1857,22
Bolívia II	1379,56	Bolívia II	1613,15
Ceará 147	1228,40	Ceará 147	1228,40
Flint Composto	1215,64	Flint Composto	1215,64
Centralmex	1077,16	Centralmex	1077,16
Opaco 2	1053,82	Opaco 2	1053,82
Acre	1015,88	Acre	1015,88

Área 1ª versus 2ª			
Paraguai V		Bolívia II	
1ª - 1619,69	sig. (1%)	1ª - 1393,67	sig. (1%)
2ª - 2094,75		2ª - 1832,63	

As células da 2ª camada, tanto de Paraguai Vco mo da Bolívia II, têm áreas significativamente maiores que as da 1ª camada. Consequentemente, estas duas variedades apresentaram áreas mais relevantes ainda quando se levou em consideração a área média entre a primeira e segunda camadas ($\frac{1^a + 2^a}{2}$), conforme o quadro XI.

4.2.4. Volume das células

Houve diferenças estatísticas também para volume, entre as variedades, ao nível de 1%.

As células da 2ª camada, embora tenham áreas maiores que as da 1ª camada, possuem volumes menores. O menor volume das células da 2ª camada, deve-se à sua menor espessura quando comparadas com as células da 1ª camada, já que em média, a sua área é maior.

Quando foi considerada a média entre a primeira e a segunda camada, o volume da Bolívia II caiu da 2ª para a 3ª colocação. Realmente, as células da 2ª camada da Bolívia II, são bem menos desenvolvidas que as de Paraguai V (Quadro XII).

QUADRO XII - Médias das variedades para volume das células em micras

Volume 1ª		Volume $\frac{1ª + 2ª}{2}$	
Paraguai V	93325,28	Paraguai V	81419,15
Bolívia II	70812,94	Ceará 147	68916,87
Ceará 147	68916,87	Bolívia II	61425,42
Opaco 2	57816,41	Opaco 2	57816,41
Centralmex	46931,32	Centralmex	46931,32
Acre	46518,07	Acre	46518,07
Flint Composto	37968,31	Flint Composto	37968,31

Volume 1ª versus 2ª

Paraguai V		Bolívia II	
1ª - 91754,21	significativo (1%)	1ª - 70268,43	sig. (1%)
2ª - 69063,21		2ª - 52582,41	

4.3. Estudo da frequência de aleurona múltipla em diferentes variedades

De 100 grãos examinados para cada variedade, o encontrado foi o seguinte:

Ceará 147 - todos os grãos com aleurona simples

Acre - 98 grãos com aleurona simples e 2 grãos com tendência à duplicação.

Opaco 2 - 97 grãos com aleurona simples, 2 grãos com tendência à duplicação e 1 grão com camada dupla.

Bolívia I - 79 grãos com aleurona simples, 12 grãos com tendência à duplicação, 7 grãos com camadas duplas e triplicadas em algumas regiões.

Paraguai V - 82 grãos com aleurona simples, 9 grãos com tendência a duplicação, 4 grãos com camada dupla e regiões triplicadas e 1 grão com camada tripla e com regiões quadruplicadas.

4.4. Estudo de correlação entre as dimensões do grão e das células de aleurona

Quase todos os valores de correlação entre as dimensões do grão e das células de aleurona foram baixos e não significativos. O quadro XIII apresenta os valores de r , para as correlações estudadas.

QUADRO XIII - Coeficientes de correlação

Variedades	Comprimento do grão x comprimento das células	Largura do grão x largura das células	Relação c/ l do grão x espessura das células	Volume do grão x volume das células
Cearã 147	0,5001*	0,2072	0,5579**	0,0965
Opaco 2	0,4776*	0,2418	-0,0542	0,1874
Centralmex	0,2785	-0,2980	-0,0192	-0,1281
Composto	0,3393	-0,2214	0,0065	0,2378
Bolívia I	0,2056	-0,0202	0,0110	0,0813
Bolívia II	0,4680	-0,0837	-0,2908	0,7585**
Paraçuai V	0,0246	0,1161	-0,0583	0,2133

Os valores com (*) são significativos ao nível de 5%

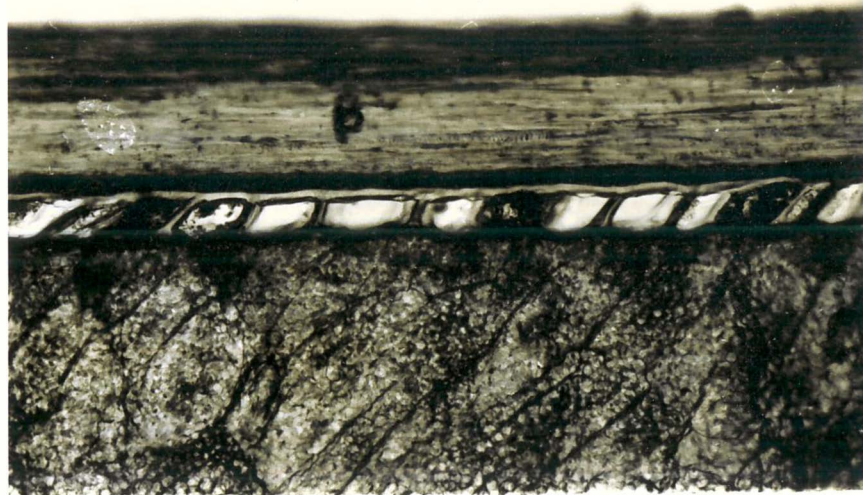
Os valores com (**) são significativos ao nível de 1%

Os valores sem nenhum asterisco não são significativos

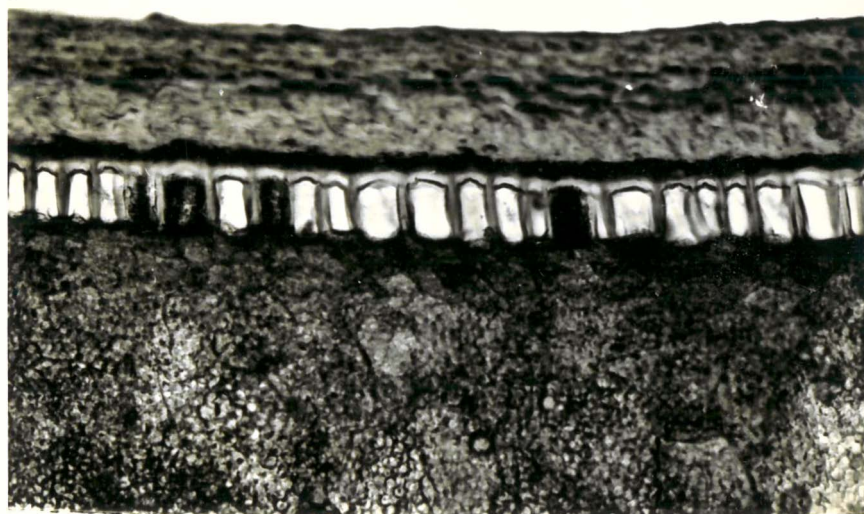
4.5. Ilustração - Fotografias

As fotografias mostram diferentes aspectos das camadas de aleurona simples e múltiplas, em cortes longitudinais e transversais. A camada de aleurona apresenta-se mais clara e está situada logo abaixo do pericarpo e acima do endosperma amiláceo, que se apresentam mais escuros.

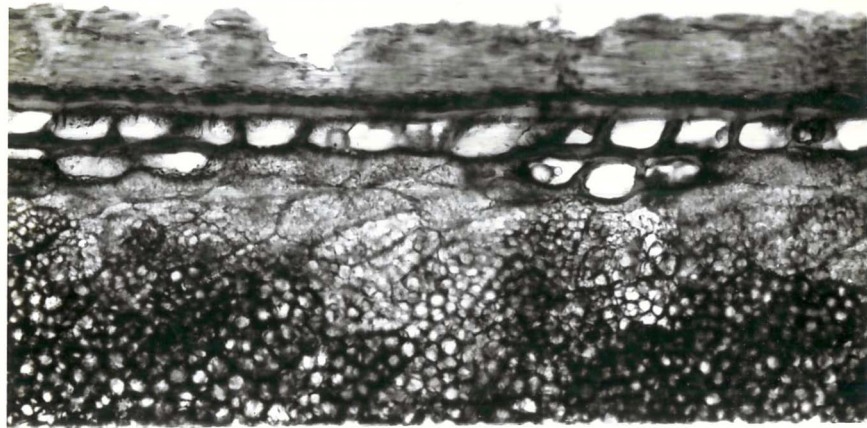
O aumento é de 140x em todas as fotografias.



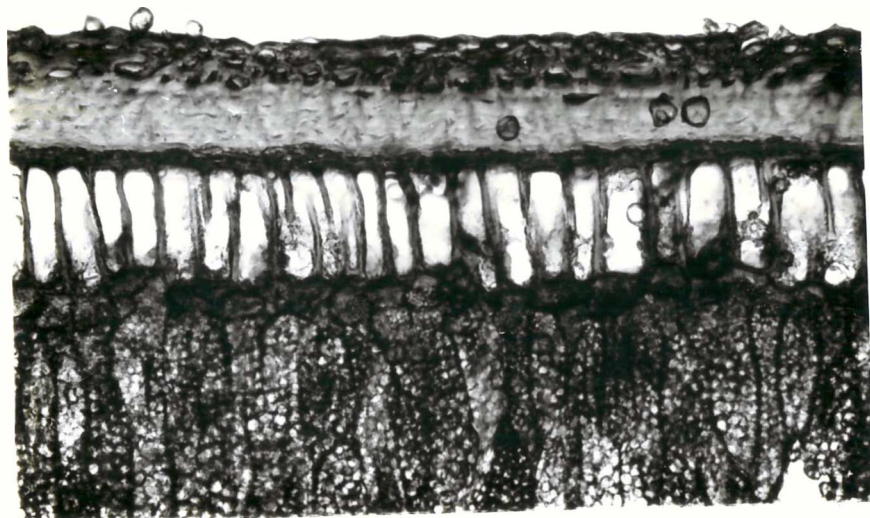
Fotog. 1 - Corte longitudinal na variedade Centralmex, mostrando a camada única de aleurona (mais clara), situada logo abaixo do pericarpo e acima do endosperma amiláceo (mias escuros). Aumento de 140x.



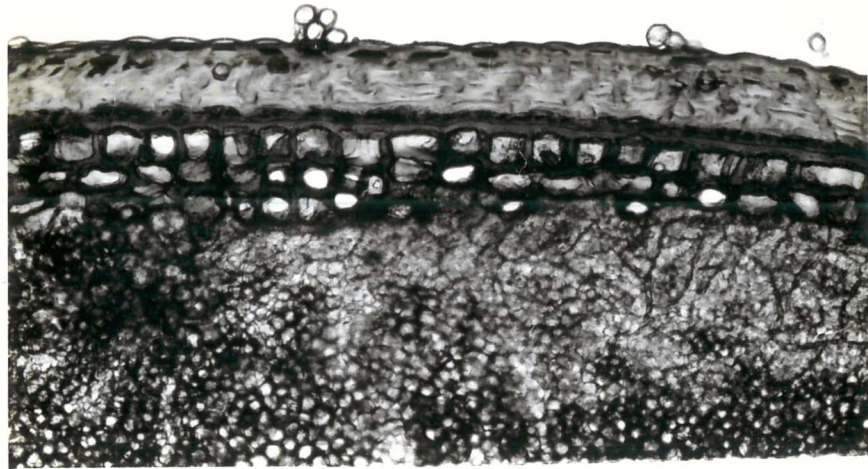
Fotog. 2 - Corte transversal na variedade Opaco 2. Aumento de 140x.



Fotog. 3 - Corte longitudinal na variedade Opaco 2, mostrando a tendência de duplicação de células em algumas regiões da camada de aleurona. Aumento de 140x.



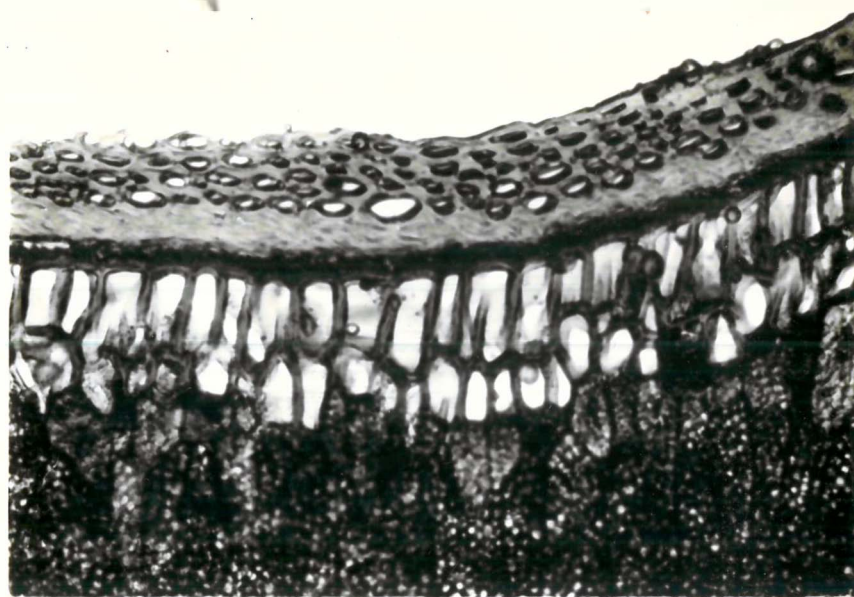
Fotog. 4 - Corte transversal na variedade Ceará 147, mostrando uma camada de aleurona simples, porém bastante espessa. Aumento de 140x.



Fotog. 5 - Corte longitudinal na variedade Bolívia II, mostrando algumas regiões da camada duplicadas e outras triplicadas. Aumento de 140x.



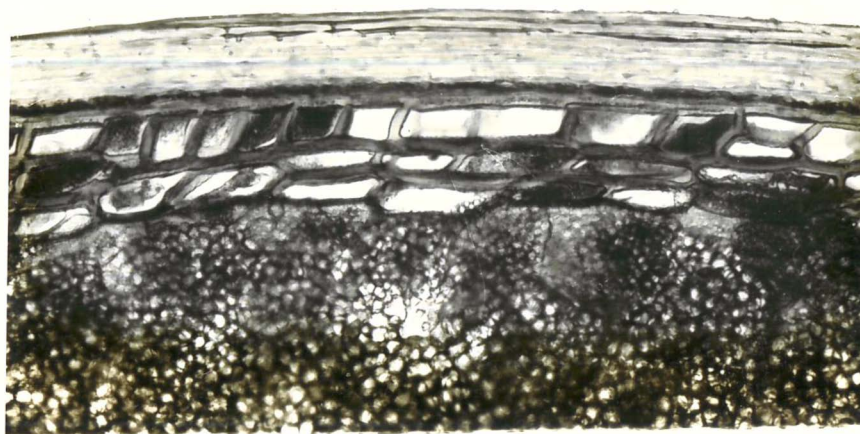
Fotog. 6 - Corte longitudinal na variedade Paraguai V, mostrando uma camada tipicamente duplicada. Aumento de 140x.



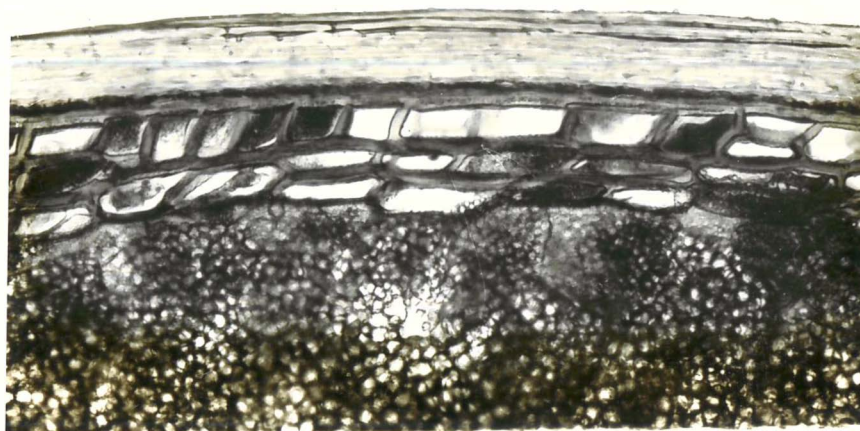
Fotog. 7 - Corte transversal na variedade Paraguai V, mostrando um aspecto de uma camada duplicada. Aumento de 140x.



Fotog. 8 - Corte longitudinal na variedade Paraguai V, mostrando uma camada triplicada em algumas regiões e quadruplicadas em outras. Aumento de 140x.



Fotog. 9 - Corte longitudinal na variedade Bolívia II, mostrando regiões duplicadas e regiões triplicadas. Aumento de 140x.



Fotog. 9 - Corte longitudinal na variedade Bolívia II, mostrando regiões duplicadas e regiões triplicadas. Aumento de 140x.

5. DISCUSSÃO

No presente, é incontestável o fato de que a maior quantidade de proteína existente na aleurona do milho coróico em relação ao milho normal, deve-se, em parte, à maior espessura do tecido de aleurona do primeiro, como consequência da superposição de camadas de células. No entanto, os autores que avaliaram a proteína do coróico e a dos milhos normais, WOLF et al (1972), afirmam que esses milhos de aleurona múltipla, além de terem maior quantidade de proteína, possuem também um maior teor proteico nas células de aleurona. Um aspecto, portanto, que nos parece bastante importante a ser discutido, é a relação existente entre o caráter "aleurona múltipla" e o teor proteico.

Devemos então, ao iniciar uma discussão sobre este aspecto, indagar: o que há de especial no caráter "aleurona múltipla" que lhe confere maior teor proteico? Até o momento, não existem dados experimentais suficientes que possam esclarecer com segurança este assunto. Por conseguinte, cabe nos levantar hipóteses com base nos resultados desta investi-

gação e nos dados disponíveis na literatura.

Uma possível explicação para o fato talvez esteja relacionada com a morfologia celular. Vimos nos resultados, que as variedades de aleurona múltipla apresentam em média, células mais volumosas que as variedades normais e essa diferença é uma indicação de que um maior volume celular possa estar associado a uma maior concentração de proteínas. Se isto for verdadeiro, devemos admitir também que o teor proteico da aleurona simples das variedades normais varie acompanhando a variação dos seus volumes celulares. Com base nesta última afirmativa, poderíamos admitir que é provável que os teores proteicos da aleurona das variedades Ceará 147 e Opaco 2, fossem bem próximos aos teores das 2 variedades de aleurona múltipla, pelo fato daquelas apresentarem volumes bem próximos aos volumes dessas, e que as variedades Composto, Bolívia I, Centralmex, Flint Composto e Acre tivessem teores inferiores.

Por outro lado, seria também cabível esperar - se encontrar na natureza, milhos de camadas múltiplas com células pouco volumosas e conseqüentemente com baixos teores proteicos. Para se averiguar estas possibilidades, é de urgência que se desenvolvam investigações, no sentido de procurar estabelecer a correlação existente entre o volume celular e o teor proteico; para isso, bastaria que fossem estimados os volumes de diferentes variedades e raças de milho e paralelamente fossem feitas dosagens químicas.

As evidências experimentais existentes, mostram que um alto teor proteico não é exclusividade dos milhos de aleurona múltipla. WOLF et al (1972) fazem referência a um tipo de milho de aleurona simples o qual denominaram de Peru 442, que possui um teor de proteína na aleurona tão alto quanto o do milho coróico. Nós não dispúnhamos desse material na época, porém seria uma informação relevante, determinar-se o seu volume celular e compará-lo com o do coróico.

Se o alto teor proteico fosse exclusividade do coróico, poderíamos ser induzidos a pensar na existência de um mecanismo genético envolvendo o gene ou genes para o caráter "aleurona múltipla" e que afetasse também o teor de proteína, como: interação gênica, efeito pleiotrópico ou outro mecanismo qualquer. No entanto, a informação obtida do milho Peru 442, acima mencionada, não nos leva a pensar desta maneira, embora não exclua a possibilidade de existir algum mecanismo genético particular, que associe o caráter "aleurona múltipla" com um alto teor proteico.

Com base nos dados existentes, é mais razoável supor-se que o gene ou genes condicionadores do caráter "aleurona múltipla", contribuam parcialmente para o aumento do volume celular e conseqüentemente para o aumento do teor proteico. Esta suposição não inadmitiria qualquer influência que porventura o caráter "aleurona múltipla" pudesse ter sobre a concentração de proteínas, porém rejeitaria a idéia de exclusividade, ou seja, de que o caráter "aleurona múltipla" fosse uma condição indispensável para que o teor proteico fosse alto.

Como vimos até agora, não é infundada a idéia de que o volume das células possam influir decisivamente na concentração de proteínas. Mesmo que se comprove este fato posteriormente, haveria ainda mais uma questão a ser esclarecida: de que maneira poderia o volume influir fisiologicamente para um maior teor? A escassez de informações existentes a este respeito não permite nenhuma conclusão de como isto poderia ocorrer. No entanto, existe uma observação relatada no trabalho de WOLF et al (1972), que permite a formulação de uma hipótese. Esta observação diz respeito à quantidade de núcleos existentes nas células de aleurona do coroico e dos milhos normais. Eles observaram que as células do milho dentado são sempre mononucleadas, enquanto as do coroico possuem de 1 a 4 núcleos. Isto nos leva a supor que possa existir alguma relação entre a quantidade de núcleos e o teor de proteína. Maior quantidade de núcleos implica também em maior quantidade de DNA por célula, a qual poderia condicionar uma maior síntese de proteínas, caso não houvesse impedimento por quaisquer mecanismo de regulação gênica. Por conseguinte, é perfeitamente cabível supor, com base na teoria da relação núcleo citoplasmática, que o aumento do volume celular seja um fenômeno normal e indispensável para contrabalançar o aumento do volume nuclear.

No que diz respeito à quantidade total de proteína na aleurona, é provável que seja influenciada também, pela maneira das células se disporem. Através dos dados obtidos, constatamos que a célula assume uma forma mais próxima a um paralelepípedo do que a de um cubo, justamente por ter sem

pre o comprimento maior que a largura. Assim, se as células se implantarem sobre as bases menores, ocuparão menor área e proporcionarão uma camada de aleurona mais espessa; se se implantarem sobre as bases maiores, haverá menor número de células por grão, e a espessura da camada será menor, embora não haja alteração no volume médio das células. A fig. 4 mostra como é possível haver uma variação na espessura da camada de aleurona, causada por duas diferentes maneiras das células se disporem e sem haver variação dos seus volumes.

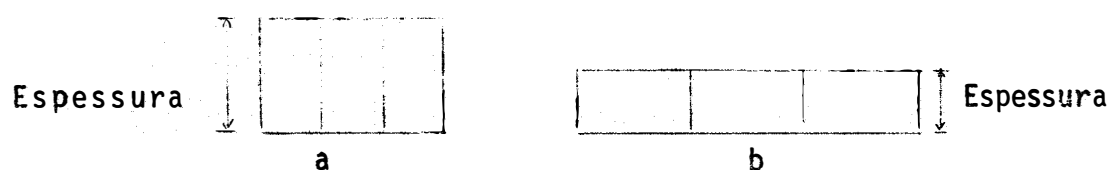


Fig. 4 - Modos de disposição das células: a) modelo de implantação sobre as bases menores; b) modelo de implantação sobre as bases maiores.

Seria esperado que a disposição do tipo a (Fig. 4) produzisse mais proteína que a do tipo b, em razão da maior espessura da camada que seria formada pela primeira. Os dados apresentados nos Quadros XXXVI a XLII (Apêndice) e as nossas observações ao microscópio, sustentam plenamente a idéia de que os referidos modelos de implantação aconteçam na realidade. Assim, por exemplo, se comparamos no Quadro XXXVI do apêndice, o grão nº 16 com o nº 27, verificamos que seus volumes são relativamente semelhantes, porém o grão nº 16, tem células com a área menor e a espessura maior que as células do grão nº 27. Esses dados fazem-nos crer, que o grão nº 16, tenha células com uma disposição mais semelhante ao modelo a,

da fig. 4, do que as do grão nº 27 e por conseguinte possua também maior quantidade de proteína na aleurona.

A literatura cita que a concentração de lisina do coróico é cerca de 3 vezes mais alta do que a do milho dente comum. Este aumento na concentração da lisina não é proporcional ao aumento da espessura da aleurona do coróico em relação a do milho dente, porém, maior. Esta desproporcionalidade é bem provável que também haja uma explicação com base no maior volume das células.

Os resultados obtidos sugerem uma perspectiva muito boa para o melhoramento proteico do milho. A simples transferência do caráter "aleurona múltipla" para as variedades comerciais, seria um passo inicial promissor que, aliado a uma posterior seleção para espessura da camada e volume das células, talvez resultasse em relevantes ganhos genéticos para proteína. A variação existente entre os grãos e entre as variedades com relação aos parâmetros estudados, dão uma indicação de que, provavelmente, exista variabilidade genética suficiente para um programa de seleção com base na camada de aleurona. WOLF et al (1972) encontraram grãos até com 6 camadas de células, fato que reforça a idéia de ser possível obter variedades comerciais com camadas múltiplas extremamente espessas, em detrimento proporcional do endosperma amiláceo.

Um outro aspecto dos resultados que nos parece de interesse ser considerado, diz respeito à relação existente entre o caráter "aleurona múltipla" e, o tipo do endosperma. Todos os grãos observados com camadas múltiplas pertencem

a variedades de endosperma tipo "floury". Existe outro estudo anterior a este, desenvolvido por BLUMENSCHHEIN (1972), que sugere a idéia de que há uma tendência do caráter "aleurona múltipla" ocorrer em milhos tipo "floury". O autor determinou 5 fontes de milho com aleurona múltipla na América do Sul e todas elas são milhos com endosperma tipo "floury". Algumas amostras de milho tipo "flint" coletadas no Nordeste brasileiro, foram observadas apresentar uma tendência muito fraca de formação de mais de uma camada, isto é, uma ou outra célula apresentava-se duplicada, porém sem nunca formar duas camadas contínuas e definidas.

Presentemente, não está determinado qual o mecanismo genético responsável pela associação da aleurona múltipla com o endosperma "floury". Poderia ser uma interação não alélica entre os alelos para aleurona múltipla com os alelos para endosperma "floury" ou outro mecanismo qualquer. A associação entre estes dois caracteres, provavelmente traria implicações práticas para o melhoramento. Seria de se esperar que tal associação dificultasse a transferência do caráter "aleurona múltipla" para as variedades de milho do tipo "flint".

Os resultados mostram também que as quatro maiores médias para volume são de variedades de endosperma do tipo "floury". É provável que, em média, na natureza, os milhos do tipo "floury" tenham células mais volumosas que os do tipo "flint". Evidentemente que o número de variedades analisadas é insuficiente para dar uma certeza de que isto realmente ocorra.

Com relação às duas metodologias usadas, a mensuração das células numa pequena região do grão proporcionou valores médios para os parâmetros, maiores que os valores obtidos pela mensuração feita em todo o grão, principalmente para espessura, área e volume. Isto indica que, ~~provavelmente,~~ a mensuração restrita à pequena região estudada leva a uma superestimação desses parâmetros, em valores absolutos. Em valores relativos, ou seja, comparando-se as posições relativas das variedades, pelos dois métodos, não houve grandes alterações, especialmente para o volume das células. Os resultados sugerem que, provavelmente, a mensuração na pequena região seja um método eficiente para determinar grãos com maiores células, comparar variedades e ineficiente para estimar as dimensões reais dos parâmetros.

Estudos mais específicos poderão determinar qual a correlação entre os dois métodos e portanto, com mais precisão estabelecer a eficiência da avaliação na pequena região do grão. Do ponto de vista prático, seria bem mais fácil fazer as mensurações na pequena região do grão, principalmente se houvesse muito material para ser analisado, como certamente haveria num programa de melhoramento.

O estudo de frequência de aleurona múltipla mostra que existem genes que condicionam multiplicidade ou tendência à multiplicidade nas variedades estudadas, com exceção da variedade Ceará 147. É provável que esta variedade também contenha esses genes numa frequência muito baixa e que os 100 grãos analisados não tenham sido suficientes para detectá-los.

WOLF et al (1972) afirmam que a aleurona múltipla parece ser controlada por um gene parcialmente dominante. Mas, os inúmeros aspectos que assumem as células quanto à formação de camadas, tendências a formação, variação do número de camadas, sugerem ser o mecanismo genético que controla o caráter, mais complexo que um simples gene parcialmente dominante. É possível que seja apenas um gene, porém haja uma série de fatores genéticos modificadores atuando na expressão do caráter.

A baixa frequência de aparecimento de grãos com camadas múltiplas bem desenvolvidas, é um forte argumento em favor de um controle poligênico para o caráter.

Atualmente, o Instituto de Genética, em Piracicaba, está desenvolvendo um estudo da herança da aleurona múltipla e espera-se ter dentro de mais algum tempo, um conhecimento preciso a este respeito.

Com referência ao estudo de correlação entre as dimensões do grão e das células de aleurona, quase totalidade dos valores encontrados para r foram baixos e não significativos. O único valor que chama mais atenção, foi o obtido para volume do grão x volume das células, na variedade Bolívia II, o qual foi $r = 0,7585$. Devemos admitir que este valor relativamente alto possa ter ocorrido como mera obra do acaso,, em consequência da amostragem usada para este estudo ter sido um pouco pequena. Por conseguinte, é mais coerente afirmar que não existem correlações entre as dimensões do grão e das células, e que as correlações significativas devem ser

reestudadas com melhores amostragens, para se verificar se os dados seriam confirmados ou não.

Se valores altos e significativos tivessem sido encontrados para algum dos tipos de correlações estudadas, seria de grande aplicabilidade prática para se selecionar a aleurona através da morfologia do grão. Como isso não ocorreu, admite-se que este critério de seleção seria infrutífero.

6. CONCLUSÕES

Os resultados desta investigação permitem as seguintes conclusões:

(1) - As diferentes formas e dimensões assumidas pelas células de aleurona de diferentes genótipos devem, provavelmente, causar uma variação no teor de proteínas. São necessários estudos adicionais com dosagens químicas para se determinar qual a configuração celular que causa o maior teor.

(2) - A grande variação existente na camada de aleurona permite o estabelecimento de um programa de melhoramento proteico no milho, através de seleção na própria camada.

(3) - As frequências de aleurona múltipla encontradas nas variedades estudadas, com exceção de Ceará 147, demonstram ser possível, por seleção em cada variedade, aumentar o número de camadas de células.

(4) - Os dados sugerem que a técnica de mensuração na "pequena região do grão" seja eficiente para se estabelecer comparações entre parâmetros de diferentes variedades, ainda que leve a uma superestimação desses parâmetros. Sua vantagem sobre a técnica de mensuração em "todo o grão", está na maior rapidez com que os dados podem ser obtidos.

(5) - A morfologia do grão não pode ser usada como critério de seleção para as células de aleurona, em virtude de não existir correlação entre as dimensões do grão e das células.

(6) - A célula de aleurona dispõe-se de forma que o seu comprimento e largura tem o mesmo sentido do eixo longitudinal e transversal do grão, respectivamente.

(7) - Provavelmente existe uma associação entre o endosperma tipo "floury" e a multiplicidade de camadas de aleurona.

(8) - As células de aleurona da 2ª camada são menos volumosas que as da 1ª camada.

7. RESUMO

Este trabalho foi conduzido no Departamento de Genética da E.S.A. "Luiz de Queiroz", em Piracicaba, e teve como objetivo estudar a camada de aleurona do milho (Zea mays L.) sob tres aspectos: 1 - dimensões das células de aleurona em milhos de camada simples e multiplas; 2 - frequência do caráter "aleurona múltipla" em algumas variedades de milho; 3 - correlações entre dimensões das células de aleurona e dimensões do grão.

Para o estudo das dimensões das células de aleurona, foram utilizadas 9 variedades de milho, das quais, 7 possuem camada simples de aleurona e duas, camadas múltiplas. Eram feitos cortes longitudinais e transversais nos grãos e deles, obteve-se, através de mensurações com o microscópio, estimativas para os seguintes parâmetros: comprimento, largura, espessura, área e volume das células. Houve grande variação desses parâmetros entre as diferentes variedades e entre os diferentes grãos dentro de cada variedade. São dis-

cutidas algumas possíveis relações existentes entre as diferentes dimensões assumidas pelas células e o teor de proteína.

Para se verificar com que frequência havia aparecimento de camadas múltiplas, 5 variedades foram utilizadas e 100 grãos de cada variedade foram cortados e analisados. Com exceção de uma variedade que não apresentou camada múltipla, as frequências encontradas variaram de 1/100 a 9/100.

Para o estudo de correlação, media-se, com um paquímetro, o comprimento, largura e espessura dos grãos antes de serem cortados. As correlações estudadas foram: comprimento do grão x comprimento das células; largura do grão x largura das células; relação comprimento/largura do grão x espessura das células e volume do grão x volume das células. Os coeficientes encontrados demonstram inexistência de correlação entre as dimensões do grão e das células de aleurona.

8. SUMMARY

This study was carried out in the Department of Genetics of E.S.A. "Luiz de Queiroz" in Piracicaba with the objective of examining three aspects of the aleurone layer of maize (Zea mays L.): 1) dimension of the aleurone cells of maize with both single and multiple layers; 2) frequency of the "multilayer aleurone" character in some varieties of maize; and 3) correlations between aleurone cell dimensions and kernel dimensions.

Nine varieties of maize were utilized to study the cell dimensions of the aleurone layer; of these, seven varieties contained simple layers and two had multiple layers. Longitudinal and transversal kernel sections were made for microscopic measurement to estimate the length, width, thickness, area and volume of the cells of the aleurone layer. Large parameter variations were observed among the different varieties and among different kernels within varieties. Possible relationships between cell dimensions and protein content are

discussed.

66.

In order to verify the frequency of the multilayer aleurone, 100 kernels of each of five varieties were sectioned and analyzed. Except for one variety which did not show the multilayer aleurone, the observed frequency varied 1/100 to 9/100.

For the correlation studies, length, width and thickness measurements were made with a calliper before the kernels were sectioned. The correlations studied were: kernel length x cell length; kernel width x cell width; length/width relationship of kernel x cell thickness and kernel volume x cell volume. The observed coefficients did not indicate any significant correlation between the kernel dimensions and those of the cell of the aleurone layer.

9. LITERATURA CITADA

BLUMENSCHNEIN, A. Fontes de milho com camadas múltiplas de Aleurona. Relatório Científico do Instituto de Genética, Piracicaba, ESALQ, (6): 29-30, 1972.

_____. As várias camadas de aleurona no milho. Atualidades Agronômicas (2): 22-24, 1973.

ESTA es la decada del maiz. Agricultura de las Americas . 21(5): 10-12, 1972.

HELM, J.L. & ZUBER, M.S. Pericarp thickness of dent corn inbred lines. Crop Science. 9: 803-804, 1969.

HINTON, J.J. The distribution of protein in the mize kernel in comparison with that in wheat. Cereal Chemistry 30: 441-45, 1953.

_____, PEERS, F.G. & SHAW, B. The B - vitamins: the unique aleurone layer. Nature 172: 993-95, 1953.

- MERTZ, E.T., BATES, L.S. & NELSON, O.E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. Science, 145(3620): 279-80, 1964.
- NELSON, O.E., MERTZ, E.T. & BATES, L.S. Second gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. Science 150(3702): 1469-70, 1965.
- RETRIEVING genes for space-age corn. Agricultural Research 20(5): 3-4, 1971.
- RICHEY, F.D. & DAWSON, R.F. Thicker aleurone inadequate explanation for higher niacin in sugary maize. Plant Physiology 29: 194-96, 1954.
- SAWICK, J. Aleurone layer in barley. Nature 173: 344, 1954.
- SNEDECOR, G.W. Samples within samples. In: _____. Statistical Methods, Ames, Iowa State University Press, 1956. Cap. 10, p. 264-68.
- STEVENS, D.J., McDERMOTT, E.E. & PACE, J. Isolation of endosperm protein and aleurone cell contents from wheat, and determination of their amino-acid composition. J. Sci. Food. Agr. 14: 284-87, 1963.
- TEAS, H.J. A morphological basis for higher niacin in sugary maize. Proc. Nat. Acad. Sci. 38: 817-22, 1952.

WOLF, M.J. et al. Structure of the mature corn Kernel. I - Gross anatomy and structural relationships. Cereal chemistry, 29(5): 321-33, 1952a.

_____. Structure of the mature corn kernel. III - Microscopic structure of the endosperm of dent corn. Cereal chemistry, 29: 349-61, 1952b.

_____. Measuring thickness of excised mature corn pericarp. Aron. J. 61(5): 777-79, 1969.

_____. Maize with multilayer aleurone of high protein content. Crop Science 12(4): 440-42, 1972.

APENDICE

Nota explicativa:

Os quadros XIV a XXXV referem-se às análises da variância para os parâmetros estudados. Os quadros XIV a XXIV dizem respeito às análises da variância dos dados obtidos no estudo da estimativa para todo o grão e os quadros XXV a XXXV, às análises da variância dos dados obtidos no estudo de uma pequena região do grão.

Os quadros XXXVI a XLII contêm os valores médios dos grãos de cada variedade estudada. Esses valores referem-se ao estudo da estimativa para todo o grão.

Os valores da espessura nas variedades de aleurona múltipla representam a soma das duas camadas e os valores da área e volume representam a média entre as duas camadas.

Todos os números relativos a comprimento, largura e espessura referem-se a micras, a área a $(\text{micras})^2$ e a volume a $(\text{micras})^3$.

Análises da variância referentes ao estudo de todo o grão.

QUADRO XIV - Análise da variância para comprimento das células (u)

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	32577,41	5429,56	15,10**
Entre grãos/var.	203	72956,55	359,39	4,15**
Dentro de grãos	3432	296591,89	86,41	
T O T A L	3641	402125,85		
C.V. = 22,10%		$\bar{X} = 41,97$		

QUADRO XV - Análise da variância para largura das células (u)

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	20950,76	3491,79	41,77**
Entre grãos/var.	203	16966,04	83,57	3,83**
Dentro de grãos	3111	67826,79	21,80	
T O T A L	3320	105743,59		
C.V. = 16,6%		$\bar{X} = 28,18$		

QUADRO XVI - Análise da variância para espessura das células-
1ª camada

FV	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var:	6	27577,09	4596,18	101,71**
Entre grãos/var.	203	115313,44	568,05	12,57**
Dentro de grãos	3099	140056,09	45,19	
T O T A L	3308	282946,62		

C.V. = 15,5%

\bar{X} = 43,47

QUADRO XVII - Análise da variância para espessura das células
1ª camada + 2ª camada

FV	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	31114,06	5185,67	120,62**
Dentro	199	8555,04	42,99	
T O T A L	205	36669,10		

C.V. = 12,9%

\bar{X} = 50,68

QUADRO XVIII - Análise da variância para espessura - 1ª camada versus 2ª camada

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre grãos B. II	25	1105,37	44,21	
1ª vs 2ª de B. II	1	4582,13	4582,13	326,84**
Erro	25	366,19	14,65	
<hr/>				
T O T A L	51	6053,80		
<hr/>				
Entre grãos P. V	29	530,38	18,28	
1ª vs 2ª de P. V	1	2869,03	2869,03	204,65**
Erro	29	390,74	13,47	
<hr/>				
T O T A L	59	3790,16		
<hr/>				
ERRO MÉDIO	54	757,04	14,01	

Observação: são apenas 25 graus de liberdade para o erro de Bolívia II porque dos 30 grãos analisados, 4 não tinham dados suficientes da 2ª camada e por isso foram desprezados.

QUADRO XIX - Análise da variância para área das células - 1ª camada

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	5611177,57	9351996,26	23,48**
Dentro	203	8084479,53	39825,02	
T O T A L	209	13695657,10		

C.V. = 16,8%

$\bar{X} = 1191,0$

QUADRO XX - Análise da variância para área das células - média entre a 1ª e 2ª camada

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	* 6	9434458,26	1572409,71	35,23**
Dentro	197	8793187,32	44635,46	
T O T A L	203	18227645,59		

C.V. = 17,3%

$\bar{X} = 1223,13$

QUADRO XXI - Análise da variância para área das células - 1ª
camada versus 2ª camada

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre grãos B. II	24	3555630,99	148151,29	
1ª vs 2ª de B. II	1	640743,69	640743,69	15,31**
Erro	24	869997,20	36249,88	
<hr/>				
T O T A L	49	5066371,88		
<hr/>				
Entre grãos P. V	28	2636383,41	94156,55	
1ª vs 2ª de P. V	1	1250040,17	1250040,17	29,87**
Erro	28	1306147,49	46648,12	
<hr/>				
T O T A L	57	5192571,07		
<hr/>				
ERRO MÉDIO	52	2176144,69	41848,94	

QUADRO XXII - Análise da variância para volume das células 1ª
camada

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	13520626853,36	2253437808,89	17,57**
Dentro	203	25882927243,91	127502104,65	
T O T A L	209	39403554097,27		

C.V. = 21,8%

\bar{X} = 51719,38

QUADRO XXIII - Análise da variância para volume das células -
média entre a 1ª e 2ª camada

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	8679113716,51	1446518952,75	12,37**
Dentro	197	23032144288,46	116914438,01	
T O T A L	203	31711258004,97		

C.V. = 21,9%

\bar{X} = 49381,93

QUADRO XXIV - Análise da variância para volume das células-
1ª camada versus 2ª camada.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
E. grãos B. II	24	3793189148,16	158049547,84	
1ª vs 2ª B. II	1	5046399348,39	5046399348,39	39,01**
Erro	24	5175126273,01	215630261,38	
<hr/>				
T O T A L	49	14014714769,56		
<hr/>				
E. grãos P. V	28	4105669377,49	146631049,20	
1ª vs 2ª P. V	1	2069805210,90	2069805210,90	16,00**
Erro	28	1551590918,05	55413961,36	
<hr/>				
T O T A L	57	7727065506,44		
<hr/>				
ERRO MÉDIO	52	6726717191,06	129359945,98	

Análises da variância referentes ao estudo da pequena região do grão.

QUADRO XXV - Análise da variância para comprimento das células.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	24559,50	4093,25	6,23**
E. grãos/var.	133	87413,73	657,24	14,00**
Dentro de grãos	1260	59145,45	46,94	
T O T A L	1399	171118,69		

C.V. = 15,9%

$\bar{X} = 42,96$

QUADRO XXVI - Análise da variância para largura das células

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	3814,64	635,77	3,40**
E. grãos/var.	133	24869,69	186,99	4,76**
Dentro grãos	1260	49529,31	39,30	
T O T A L	1399	78213,65		

C.V. = 22,3%

$\bar{X} = 28,10$

QUADRO XXVII - Análise da variância para espessura das células - 1ª camada

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	113659,17	18943,19	20,48**
E. grãos/var.	133	123038,46	923,10	36,64**
Dentro grãos	1260	31815,89	25,25	
<hr/>				
T O T A L	1399	268513,53		

C.V. = 10,2%

\bar{X} = 49,09

QUADRO XXVIII - Análise da variância para espessura das células - 1ª camada + 2ª camada

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	39192,91	6532,15	59,12**
Dentro	118	13038,06	110,49	
<hr/>				
T O T A L	124	52230,97		

C.V. = 19,4%

\bar{X} = 54,04

QUADRO XXIX - Análise da variância para espessura das células
- 1ª camada versus 2ª camada.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	1	252,24	252,24	3,00 ns.
1ª vs 2ª B. II	1	3565,84	3565,84	42,41 **
1ª vs 2ª P. V	1	7000,47	7000,47	83,26 **
Erro médio	61	5128,93	84,08	
T O T A L	64	15947,49		

C.V. = 19,7%

\bar{X} = 46,56

QUADRO XXX - Análise da variância para área das células - 1ª
camada.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	4721416,85	786902,80	9,80**
Dentro	133	10674544,63	80259,73	
T O T A L	139	15395961,48		

C.V. = 23,2%

\bar{X} = 1219,73

QUADRO XXXI - Análise da variância para área das células média entre a 1ª e 2ª camada

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	8931040,26	1488506,71	18,88**
Dentro	116	9145602,47	78841,40	
T O T A L	122	18076642,73		
C.V. = 22,7%		$\bar{X} = 1237,40$		

QUADRO XXXII - Análise da variância para área das células - 1ª camada versus 2ª camada

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
1ª vs. 2ª B. II	1	674404,98	674404,98	8,53**
1ª vs 2ª P. V	1	1692648,28	1692648,28	21,40**
ERRO MÉDIO	20	1581846,69	79092,33	

QUADRO XXXIII - Análise da variância para volume das células - 1ª camada

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	42979445843,21	7163240973,86	23,80**
Dentro	133	40021095174,30	300910490,03	
T O T A L	139	83000541017,52		
C.V. = 28,8%		$\bar{X} = 60327,00$		

QUADRO XXXIV - Análise da variância para volume das células -
média entre a 1ª e 2ª camada.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Entre var.	6	22585233736,62	3764205622,77	12,89**
Dentro	114	33300484469,61	292109512,89	
T O T A L	120	55885718206,23		

C.V. = 30,7%

\bar{X} = 55643,52

QUADRO XXXV - Análise da variância para volume das células -
1ª camada versus 2ª camada

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
1ª vs 2ª B. II	1	1094782500,88	1094782500,02	7,05*
1ª vs 2ª P. V	1	3861623025,64	3861623025,64	24,86**
ERRO MÉDIO	20	3106812993,92	155340649,70	

QUADRO XXXVI - Valores médios dos grãos da variedade Ceará 147

Grãos	Comprimento	Largura	Espessura	Área	Volume
1	39,30	26,70	52,36	1049,80	54967,53
2	39,60	26,60	42,97	1053,36	45262,88
3	48,00	30,80	56,81	1478,40	83987,90
4	35,30	24,60	49,61	868,38	43080,33
5	49,80	25,60	60,26	1274,88	76824,27
6	42,20	25,20	51,11	1063,44	54352,42
7	38,30	26,70	42,15	1022,61	43103,01
8	43,60	28,40	47,95	1238,24	59373,61
9	43,10	26,70	37,26	1150,77	42877,69
10	47,00	27,50	55,03	1292,50	71126,28
11	46,30	26,80	49,59	1240,84	61533,26
12	41,60	30,00	46,98	1248,00	58631,04
13	48,50	32,40	44,35	1571,40	69691,59
14	38,40	24,70	40,40	948,48	38318,59
15	40,30	26,80	44,53	1080,04	48094,18
16	43,50	28,80	50,83	1252,80	63679,82
17	32,30	22,10	48,47	713,83	34599,34
18	38,80	27,50	54,07	1067,00	57692,69
19	49,40	26,30	51,79	1299,22	67286,60
20	38,00	24,40	69,88	927,20	64792,74
21	50,70	28,50	54,25	1444,95	78388,54
22	42,50	29,00	38,34	1232,50	47254,05
23	39,70	27,00	53,67	1071,90	57528,87
24	50,10	29,60	42,69	1482,96	63307,56
25	52,10	27,60	41,26	1437,96	59330,23
26	48,20	29,50	46,95	1421,90	66758,21
27	52,90	29,90	40,46	1581,71	63995,99
28	45,00	26,30	41,97	1183,50	49671,50
29	40,70	25,00	35,14	1017,50	35754,95
30	44,60	28,10	37,11	1253,26	46508,48

QUADRO XXXVII - Valores médios dos grãos da variedade Opaco 2

Grãos	Comprimento	Largura	Espessura	Área	Volume
1	45,80	30,30	35,97	1387,74	49917,01
2	42,00	24,80	40,62	1041,60	42309,79
3	47,40	27,10	42,51	1284,54	65100,49
4	44,70	26,70	50,15	1193,49	59853,52
5	55,80	37,10	52,70	2070,18	109098,49
6	45,70	26,10	42,60	1192,77	50812,00
7	35,40	25,60	45,68	906,24	41397,04
8	45,80	31,00	42,07	1419,80	59730,99
9	51,70	28,80	41,01	1488,96	61062,25
10	42,40	25,00	41,57	1060,00	44064,20
11	38,70	30,90	56,05	1195,83	67026,27
12	40,60	28,20	48,09	1144,92	55059,20
13	41,10	25,80	43,94	1060,38	46593,10
14	51,20	25,70	43,93	1315,84	57804,85
15	47,20	34,20	49,23	1614,24	79469,04
16	41,90	28,50	43,11	1194,15	51479,81
17	41,80	25,10	46,59	1049,18	48881,30
18	43,20	27,60	57,41	1192,32	68451,09
19	39,10	27,70	39,26	1083,07	42521,33
20	35,60	25,80	41,25	918,48	37887,30
21	37,40	32,30	44,88	1208,02	54215,94
22	49,50	27,40	39,49	1356,30	53560,29
23	41,00	29,20	50,07	1197,20	59943,80
24	41,10	31,00	50,37	1274,10	64176,42
25	49,70	28,40	48,47	1411,48	68414,44
26	42,40	29,20	42,43	1238,08	52531,73
27	38,60	27,00	38,98	1042,20	40624,96
28	41,50	27,40	45,09	1137,10	51271,84
29	41,70	25,70	40,43	1071,69	43328,43
30	37,30	25,80	38,90	962,34	37435,03

QUADRO XXXVIII - Valores médios dos grãos da variedade Centralmex

Grãos	Comprimento	Largura	Espessura	Área	Volume
1	43,60	24,70	44,49	1076,92	47912,17
2	49,40	30,40	39,37	1501,76	59124,29
3	42,70	26,70	42,51	1140,09	48465,23
4	33,30	25,80	47,02	859,14	40396,76
5	39,50	25,20	34,51	995,40	34351,25
6	36,40	24,40	42,68	888,16	37906,67
7	40,30	26,70	45,34	1076,01	48786,29
8	36,20	26,80	32,97	970,16	31986,18
9	40,30	26,30	39,84	1059,89	42226,02
10	37,40	24,80	39,47	927,52	36609,21
11	41,30	27,10	29,34	1119,23	32838,21
12	40,20	30,70	42,89	1234,14	52932,26
13	41,10	25,90	45,52	1064,49	48455,59
14	47,50	27,20	33,01	1300,16	42918,28
15	33,10	25,90	36,91	857,29	31642,57
16	40,00	27,70	37,98	1108,00	42081,84
17	29,30	29,50	45,33	864,35	39180,99
18	38,10	26,70	33,38	1017,27	33956,47
19	36,10	24,40	37,76	884,45	33396,83
20	34,50	25,00	42,58	862,50	36725,25
21	41,20	23,50	44,43	968,20	43017,13
22	39,50	26,90	31,49	1062,50	33459,70
23	42,60	24,30	33,60	1035,18	34782,05
24	44,90	26,70	34,63	1198,83	41515,48
25	31,80	25,40	41,93	807,72	33867,70
26	38,10	27,80	54,05	1059,18	57248,68
27	38,00	22,60	41,18	858,80	35365,38
28	45,40	26,20	37,89	1189,49	45069,40
29	50,70	28,00	47,91	1419,60	68013,04
30	37,30	24,90	38,24	928,77	35516,16

QUADRO IXL - Valores médios dos grãos da variedade Composto

Grãos	Comprimento	Largura	Espessura	Área	Volume
1	40,00	29,00	45,15	1160,00	52374,00
2	45,20	27,30	48,83	1233,96	60254,27
3	34,40	22,60	53,10	777,44	41282,06
4	37,20	28,30	44,02	1052,76	46342,50
5	36,60	25,10	42,23	918,66	38795,01
6	57,10	32,90	34,97	1878,59	65694,29
7	42,90	27,80	36,92	1192,62	44031,53
8	45,40	26,10	50,69	1184,94	60064,61
9	41,00	24,70	35,50	1012,70	35950,85
10	41,10	24,50	35,17	1006,95	35414,43
11	48,30	25,70	33,99	1241,31	42192,13
12	37,20	27,00	37,94	1004,40	38106,94
13	50,10	28,80	27,32	1442,88	39419,48
14	45,50	27,20	35,18	1237,60	43538,77
15	48,30	27,60	35,31	1333,08	47071,05
16	45,80	25,70	30,72	1177,06	36159,28
17	58,90	28,00	40,69	1649,20	67105,95
18	37,90	27,10	44,02	1027,09	45212,50
19	40,70	27,10	30,77	1102,97	33938,39
20	42,20	25,50	46,19	1076,10	49705,05
21	41,80	29,10	36,06	1216,38	43862,66
22	39,30	23,10	36,92	907,83	33517,08
23	41,80	25,50	39,86	1065,90	42486,77
24	52,70	26,60	37,44	1401,82	52484,14
25	43,40	32,30	32,82	1401,83	46008,06
26	38,70	25,80	36,08	998,46	36024,44
27	42,90	26,10	45,13	1119,69	50531,61
28	42,00	23,80	36,92	999,60	36905,53
29	39,00	21,90	36,53	854,10	31200,27
30	45,50	27,20	36,58	1237,60	45271,41

QUADRO XL - Valores médios dos grãos da variedade Bolívia I

Grãos	Comprimento	Largura	Espessura	Área	Volume
1	33,20	25,20	40,74	836,64	38084,71
2	37,10	27,80	49,05	1031,38	50589,19
3	36,50	25,10	46,05	916,15	42188,71
4	32,50	23,60	44,67	767,00	34261,89
5	42,50	26,30	46,61	1117,75	52098,33
6	34,30	25,30	37,08	867,79	32177,65
7	31,60	24,20	53,41	764,72	40843,70
8	32,40	23,90	51,36	774,36	39771,13
9	33,10	24,40	56,43	807,64	45575,13
10	36,30	24,00	43,13	871,20	37574,86
11	34,10	23,40	43,16	797,94	34439,09
12	43,30	28,40	40,73	1229,72	50086,50
13	36,20	27,00	44,02	977,40	43025,15
14	35,70	25,40	43,17	906,78	39145,69
15	29,00	22,60	44,26	655,40	29008,00
16	34,80	26,00	40,73	904,80	36852,50
17	37,10	27,60	45,67	1023,96	46764,25
18	38,50	26,30	40,44	1012,55	40947,52
19	41,50	26,80	53,35	1112,20	59335,87
20	39,80	24,40	44,58	971,12	43292,53
21	37,00	25,20	53,77	932,40	50135,15
22	39,30	25,80	44,46	1013,94	45079,77
23	34,10	24,70	40,75	842,27	34322,50
24	32,90	23,90	49,22	786,31	38702,18
25	38,20	25,10	53,91	958,82	51689,99
26	38,10	25,40	40,87	967,74	39551,53
27	34,10	25,02	46,03	852,50	39240,58
28	42,80	25,30	41,34	1082,84	44764,61
29	38,00	24,40	46,60	927,20	43207,52
30	32,50	25,40	52,98	825,50	43734,99

QUADRO XLI - Valores médios dos grãos da variedade Bolívia II

Grãos	Comprimento	Largura	Espessura	Área	Volume
1	46,00	38,20	53,09	1684,78	45145,78
2	43,40	34,50	56,98	1434,50	41320,44
3	37,00	29,60	53,94	1097,68	29590,12
4	45,30	31,40	58,95	1449,09	42576,58
5	49,00	36,80	53,96	1885,22	50257,93
6	45,20	32,40	55,90	1483,49	41327,52
7	48,80	33,70	54,73	1771,68	47583,92
8	38,50	31,50	64,66	1288,67	41045,36
9	41,70	30,60	65,73	1336,16	43517,95
10	40,40	33,00	65,63	1238,82	42040,68
11	41,00	31,20	68,75	1293,26	44329,63
12	40,20	26,80	59,89	1206,86	35162,24
13	37,90	28,00	-----	-----	-----
14	41,50	32,80	67,25	1672,91	53064,37
15	37,40	30,50	60,74	1431,15	40219,70
16	33,20	28,70	61,76	1221,35	34901,20
17	39,50	35,10	73,31	1512,60	54251,61
18	50,80	40,50	86,73	2304,74	97282,44
19	35,70	29,60	61,06	1232,36	36336,51
20	35,90	28,50	-----	-----	-----
21	39,40	32,00	-----	-----	-----
22	40,50	30,30	77,74	1340,18	50751,00
23	41,50	29,00	75,21	1299,07	47771,11
24	38,90	32,00	71,83	1454,99	49226,08
25	42,30	34,60	75,68	1805,05	65421,09
26	40,10	30,10	75,05	1273,68	46919,68
27	48,90	31,50	-----	-----	-----
28	42,60	31,60	76,44	1707,98	51366,43
29	41,60	31,00	76,86	-----	-----
30	45,10	32,30	77,83	1370,97	54398,72

QUADRO XLII - Valores médios dos grãos da variedade Paraguai V

Grãos	Comprimento	Largura	Espessura	Área	Volume
1	40,80	32,60	62,81	1449,15	44914,61
2	52,50	33,10	75,08	2129,34	75807,93
3	44,40	30,80	73,65	1539,78	55561,33
4	39,60	35,40	69,13	1354,64	47010,44
5	50,70	35,10	65,48	1824,98	59530,06
6	42,10	29,30	83,39	1526,83	59761,75
7	48,10	34,10	76,49	1712,44	64578,92
8	47,20	30,40	70,58	1436,88	50695,32
9	45,70	33,50	79,49	1474,97	59089,84
10	42,70	31,70	63,91	1423,66	45138,72
11	48,50	34,60	78,50	1794,91	69848,65
12	42,00	33,20	72,24	1485,16	53306,19
13	47,10	29,20	65,40	1794,50	55246,80
14	44,60	32,20	71,27	1576,42	55329,02
15	41,60	32,30	71,06	1369,34	48505,62
16	44,20	31,40	77,94	1685,74	63468,28
17	41,20	29,10	76,04	1331,88	49651,51
18	45,80	30,30	70,46	1808,61	60758,62
19	43,70	29,00	72,84	1268,69	46200,66
20	48,20	31,10	71,66	1835,81	63611,52
21	42,50	30,00	70,56	1108,71	40026,56
22	49,30	31,20	76,03	1566,58	59399,65
23	48,00	29,50	73,42	1737,55	61563,55
24	47,50	30,60	66,29	1707,75	55091,86
25	48,50	31,60	91,12	1511,07	69067,40
26	45,70	32,80	81,34	1646,80	65146,44
27	44,80	34,00	69,03	-----	68671,74
28	50,10	33,60	74,35	1896,36	56734,48
29	44,30	32,20	69,14	1686,40	-----
30	45,80	30,50	71,70	1571,65	55408,80