ESTUDO DO CARÁTER POLIEMBRIONIA EM MILHO (*Zea mays* L.)

ANETE PEREIRA DE SOUZA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Dr. JOSÉ ROBERTO MÔRO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: *Genética e Melhoramento de Plantas*.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 1987

S729e

Souza, Anete Pereira

Estudo do caráter poliembrionia em milho (Zea mays L.). Piracicaba, 1987.

172p. ilustr.

Diss. (Mestre) - ESALQ

Bibliografia

1. Milho - Poliembrionia. 2. Milho - Teor de óleo. 3. Milho - Herança. I. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

CDD 633.15

ESTUDO DO CARÁTER POLIEMBRIONIA EM MILHO (Zea mays L.)

Anete Pereira de Souza

Aprovada em 03/08/87

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. José Roberto Mõro

ESALQ/USP

Prof. Dr. João Rubens Zinsly

ESALQ/USP

Dr. Yves H. Savidan

EMBRAPA-CNPGC

Prof. Dr. José Roberto Mõro

.i.

A minha querida família,

Clóvis, Maura, Ice, Marco,
Cleonice, André, Sarah,
Davi, Júnior e Simone,

com carinho,

DEDICO

.ii.

Ao Prof. Dr. Ernesto Paterniani,
melhorista, que pela sua competência,
entusiasmo e dedicação constante,
será sempre um exemplo para mim,

MINHA HOMENAGEM

AGRADECIMENTOS

Meu reconhecimento às pessoas e às instituições que tornaram possível a realização deste trabalho:

- Ao Dr. *José Roberto Môro*, pela orientação e amizade.
- Ao Prof. Dr. *João Rubens Zinsly*, que muito admiro, pelo estímulo e amizade que sempre me dedicou.
- Aos Profs. Dr. *Carlos H.W. Flechtmann*, Dr. *Geraldo Antonio Tosello*, Dra. *Margarida L.R. de Aguiar-Perecin* e Dra. *Maria Lúcia C. Vieira*, pelo apoio, sugestões e facilidades obtidas na utilização dos laboratórios para realização das análises do teor de óleo das sementes, estudo da embriogênese e fotomicrografias.
- Ao Dr. *Yves H. Savidan*, pela inestimável ajuda nas análises citológicas e genéticas e especialmente, pela atenção que sempre me foi dispensada.
- A *Ingrid B.I. de Barros*, pela amizade, sugestões e críticas a este trabalho.
- A *Arlete B. Marchi*, *Edimilson Linares* e *Giancarlo C. X. Oliveira*, meus amigos em todos os momentos.
- Aos funcionários do Departamento de Genética, especialmente *Srs. Antonio Serrano*, *Sérgio Roberto de Castro*, *Waldemar Beltrame* e *Walter Pedro Pompermayer* pela ajuda e atenção, desde 1982, quando iniciei estágio no Setor de Melhoramento de Milho.

- Ao Laboratório de Análises de Sementes, do Departamento de Agricultura e Horticultura desta Instituição, pela possibilidade de realização dos testes de germinação.
- A minha família, pela compreensão de tantos momentos de ausência.
- Ao Sr. *Cleusval Bissi*, pelo excelente trabalho dactilográfico e atencioso atendimento.
- À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, pela concessão da bolsa de estudos.

A AUTORA

MEMÓRIA

Amar o perdido
deixa confundido
este coração.

Nada pode o olvido
contra o sem sentido
apelo do Não.

As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão.

Mas as coisas findas,
muito mais que lindas,
estas ficarão.

CARLOS DRUMMOND DE ANDRADE

Í N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.	4
2.1. Embriogênese em Milho	4
2.1.1. Ontogenia do Embrião em Milho.	6
2.2. Poliembryonia	9
2.2.1. Poliembryonia em Monocotiledôneas.	18
2.2.2. Poliembryonia em Dicotiledôneas.	33
2.3. Herança do Caráter Poliembryonia	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.	41
3.1. Local da Execução dos Experimentos.	41
3.2. Material utilizado nos Cruzamentos.	42
3.3. Estudo da Herança do Caráter Poliembryonia.	42
3.3.1. Obtenção da Geração F ₁	43
3.3.2. Obtenção da Geração F ₂	43
3.3.3. Obtenção da Geração de Retrocruzamentos	44
3.3.4. Obtenção da Geração F ₃	46
3.3.5. Obtenção das Gerações S ₁ e de Híbridos na população ESALQ-POLI-VD2.	47
3.3.6. Avaliação das Progenies obtidas e dos Parentais.	47
3.3.6.1. Avaliação dos Parentais	48
3.3.6.2. Avaliação da Geração F ₁	48

3.3.6.3. Avaliação da Geração F_2 . . .	49
3.3.6.4. Avaliação da Geração F_3 , Retrocruzamentos e Gerações S_1 e de Híbridos da população ESALQ-POLI-VD2.	49
3.4. Comparação da Eficiência da Metodologia Empregada para Avaliação da Porcentagem de Poliembrionia.	49
3.5. Avaliação do Teor de Óleo das Sementes Monoembriônicas e Poliembrionicas.	50
3.6. Análise Citológica da Embriogênese nas Progenies Poliembrionicas.	51
3.6.1. Preparo do Material para Análise da Embriogênese.	51
3.6.1.1. Adaptação da "Técnica de Clareamento" para o Estudo da Embriogênese em Milho.	53
3.6.2. Estudo da Embriogênese.	53
3.7. Identificação dos Cruzamentos Realizados para o Estudo da Herança do Caráter Poliembrionia.	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	56
4.1. Estudo da Embriogênese em Progenies Poliembrionicas.	56
4.1.1. Adaptação da Técnica de Clareamento para o estudo da embriogênese em milho . . .	56
4.1.2. Estudo da Embriogênese.	59
4.2. Estudo do Fenótipo das Plantas Múltiplas. . .	93
4.2.1. Semente.	93

4.2.1.1. Análise do Teor de Óleo das Sementes Monoembriônicas e Poliembriônicas.	96
4.2.2. Plântula.	99
4.2.3. Planta Adulta	103
4.3. Estudo da Herança do Caráter Poliembrionia em Milho.	111
4.3.1. Geração F_1	113
4.3.2. Geração F_2	118
4.3.3. Geração F_3	126
4.3.4. Geração de Retrocruzamento	129
4.3.5. Discussão dos Resultados Obtidos nas Gerações F_1 , F_2 , F_3 e Retrocruzamento.	132
4.3.6. Avaliação da Frequência de Poliembrionia em Progenies Poliembriônicas.	138
5. CONCLUSÕES.	153
6. LITERATURA CITADA.	156
7. APÊNDICE.	169

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Dicotiledôneas que apresentam poliembria. . .	34
2 - Identificação dos cruzamentos realizados . . .	55
3 - Dissecções de óvulos e sementes imaturas, realizadas sob lupa, para estudo da embriogênese em milho empregando-se a técnica de clareamento.	58
4 - Estruturas observadas em diferentes estágios da embriogênese em progênies poliembriônicas de milho, da população ESALQ-POLI-VD2, empregando-se a técnica de clareamento.	68
5 - Resultados da análise de embriogênese. Idade do material, número de observações e porcentagem de poliembria observada em plantas múltiplas selecionadas da população ESALQ-POLI-VD2. .	72
6 - Resultados da análise do teor de óleo das sementes mono e poliembriônicas, em termos de média ($\bar{M}$) de 30 progênies obtidas de plantas múltiplas selecionadas da população ESALQ-POLI-VD2. .	98
7 - Número de sementes com 2 a 7 plântulas e número total de sementes poliembriônicas em progênies endogâmicas (S_1) e de irmãos germanos (IG), obtidas a partir de plantas múltiplas selecionadas da população ESALQ-POLI-VD2.	104
8 - Número total de espigas colhidas e índice espigas/semente poliembriônicas observado em um bloco constituído por plantas múltiplas selecionadas da população ESALQ-POLI-VD2.	110
9 - Resultado da análise dos parentais em teste de germinação P1: população ESALQ-POLI-VD2, P2: linhagens com o gene marcador braquítico, e P3: linhagens com o gene marcador liguleless. .	112
10 - Número total de progênies obtidas nas gerações F_1 , F_2 e F_3	114

TabelaPágina

11 - Número total de progênies analisadas quanto a frequência de poliembriõnia, das gerações F ₁ , F ₂ e F ₃	115
12 - Número total de progênies F ₁ e de sementes avaliadas. Número de plântulas e porcentagem média ($\bar{M}$) de germinação em cada tratamento. . . .	116
13 - Resultados da análise em testes de germinação das progênies F ₁ obtidas. Número total, porcentagem de progênies poliembriônicas e de plântulas observadas em cada tratamento.	117
14 - Número total de progênies F ₂ e de sementes analisadas, obtidas através da autofecundação das plântulas múltiplas que apareceram na geração F ₁ . Número de plântulas e porcentagem média ($\bar{M}$) de germinação nos tratamentos II e IV.	119
15 - Resultados da análise em testes de germinação das progênies F ₂ , obtidas através da autofecundação das plantas múltiplas que apareceram na geração F ₁ . Número total e porcentagem de progênies poliembriônicas e de plântulas observadas em cada tratamento.	120
16 - Número total de progênies F ₂ e de sementes avaliadas. Número de plântulas e porcentagem média ($\bar{M}$) de germinação em cada tratamento. . . .	122
17.a - Resultados da análise em testes de germinação das progênies F ₂ . Número total, porcentagem de progênies poliembriônicas e de plantas múltiplas observadas em cada tratamento.	123
17.b - Total de progênies da geração F ₁ que apresentaram poliembriõnia entre suas progênies da geração F ₂ . .	124
18 - Número total de progênies F ₃ e de sementes avaliadas. Número de plântulas e porcentagem média ($\bar{M}$) de germinação nos tratamentos I, II e III.	127
19 - Resultados de análise em testes de germinação das progênies F ₃ . Número total, porcentagem de progênies poliembriônicas e de plântulas múltiplas observadas em cada tratamento.	128

TabelaPágina

20 - Número total de retrocruzamentos e de sementes avaliados. Número de plântulas e porcentagem média ($\bar{M}$) de germinação nos tratamentos V, VI, VII e VIII.	130
21 - Resultados da análise em testes de germinação das progênes obtidas nos retrocruzamentos(RC). Número total, porcentagem de progênes poliembriônicas e de plântulas múltiplas observadas em cada tratamento.	131
22 - Resumo dos resultados obtidos da porcentagem de poliembrionia nos parentais e gerações F_1 , F_2 , F_3 , e retrocruzamentos.	133
23 - Comparação entre a avaliação das progênes quanto a porcentagem de poliembrionia através de teste de germinação e através de dissecação das sementes.	136
24 - Número total de progênes endogâmicas (S_1), de meios-irmãos (MI) e de irmãos-germanos (IG) entre plantas múltiplas (Poli), progênes endogâmicas (S_1) de plantas únicas (mono) e progênes de irmãos-germanos entre plantas múltiplas e plantas únicas (poli X mono). Número total de sementes analisadas, de plântulas observadas e porcentagem média ($\bar{M}$) de germinação em cada tratamento.	139
25 - Resultados da análise em testes de germinação das progênes endogâmicas (S_1), de meios-irmãos (MI) e de irmãos-germanos (IG) entre plantas múltiplas (poli), progênes endogâmicas (S_1) de plantas únicas (mono) e progênes de irmãos-germanos entre plantas múltiplas e plantas únicas (poli X mono). Número total, porcentagem de progênes poliembriônicas e de plântulas múltiplas observadas em cada tratamento.	140
26 - Porcentagem de poliembrionia observada em diferentes tipos de progênes obtidas a partir de plantas múltiplas.	148

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Saco embrionário maduro. 250x. (KIESSELBACH, 1949).	5
2 - Prô-embriões nos estágios de 4 a 10 dias após a polinização, em secções longitudinal-radiais. .	7
3 - Embriões em secções longitudinal-radiais, no estágio de 10 a 45 dias após a polinização. . . .	10
4 e 5 - Saco embrionário em desenvolvimento.	60
6 - Aspecto do saco embrionário quatro dias após a polinização.	62
7-8-9 - Prô-embriões de milho.	63
10-11-12-Prô-embriões em início de diferenciação. . . .	65
13-14 - Embriões com 10 dias.	66
15 - Detalhe do ápice do eixo embrionário de monoembriões em diferenciação.	69
16 - Embriões anormais em desenvolvimento	70
17 - Embriões com 9 e 10 dias.	78
18 - Embriões com 14 dias.	79
19 - Embriões com 14 dias.	80
20 - Embrião com 15 dias.	81
21 - Embriões com 15 dias	82
22 - Embrião com 15 dias apresentando o escutelo (e) dividido.	83
23 - Embrião com 15 dias diferenciado em eixo embrionário e escutelo.	84

FiguraPágina

24	- Monoembrião com 17 dias diferenciado em eixo embrionário e escutelo.	85
25	- Embrião com 17 dias diferenciado em 2 escute- los e 2 eixos embrionários.	86
26	- Embrião com 17 dias diferenciado em escutelo e eixo embrionário.	87
27	- Embrião com 17 dias apresentando 3 brotações em início de diferenciação.	88
28	- Eixos embrionários de embriões com 19 dias.	89
29	- Eixos embrionários de embriões com 20 dias.	90
30	- Ápice de eixo embrionário diferenciado em pri- mórdios foliares.	91
31	- Ápice duplicado do eixo embrionário de um em- brião com 21 dias.	92
32	- Sementes poliembriônicas e monoembriônica . .	94
33	- Variações fenotípicas das plântulas múltiplas.	101
34	- Distribuição do número de plântulas por se- mente poliembriônica entre progênies de ir- mãos-germanos e endogâmicas obtidas de plan- tas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2. . .	105
35	- Plantas gêmeas idênticas.	107
36	- Espigas colhidas de 4 conjuntos de plantas mül- tiplas.	109
37	- Distribuição da porcentagem de poliembrionia entre as progênies de meios-irmãos obtidas de plantas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2. .	141

Figura

Página

38	- Distribuição da porcentagem de poliembrionia entre as progênies de irmãos-germanos obtidas entre plantas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2	142
39	- Distribuição da porcentagem de poliembrionia entre as progênies endogâmicas (S_1) obtidas de plantas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2. .	143
40	- Distribuição da porcentagem de poliembrionia entre as progênies endogâmicas (S_1) obtidas de plantas únicas (monoembriônicas) da população ESALQ-POLI-VD2.	144
41	- Distribuição da porcentagem de poliembrionia entre as progênies do cruzamento de plantas múltiplas (poli) com plantas únicas (mono) da população ESALQ-POLI-VD2.	145

ESTUDO DO CARÁTER POLIEMBRIONIA
EM MILHO (*Zea mays* L.)

AUTORA: Anete Pereira de Souza

ORIENTADOR: Dr. José Roberto Mõro

RESUMO

Com o objetivo de se analisar as alterações fenotípicas provocadas e também a origem e a herança do caráter poliembrionia em milho, foram realizadas as seguintes avaliações: 1- análise do teor de óleo de sementes monoembriônicas e poliembriônicas; 2- avaliações fenotípicas de plantas múltiplas durante seu desenvolvimento e 3- estudos embriológicos e genéticos em progênies poliembriônicas. Estas foram obtidas através do cruzamento da população ESALQ-POLI-VD2 que apresenta o caráter em estudo, com linhagens que apresentavam genes marcadores, e não possuem poliembrionia.

Nas análises do teor de óleo empregou-se o método de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A embriogênese foi estudada através da Técnica de Clareamento, desenvolvida por HERR (1971). A herança do caráter foi analisada nas gerações F_1 , F_2 , F_3 , retrocruzamento, progênies S_1 , de irmãos-germanos e meios-irmãos obtidas de plantas múltiplas. As análi-

ses genéticas foram realizadas através da contagem do número de plântulas múltiplas por progênie, presentes em testes de germinação.

Os resultados obtidos indicaram que não há diferença entre o teor de óleo de sementes monoembriônicas e poliembriônicas. A poliembrionia origina-se através de clivagem e proliferações do pró-embrião, que surgem durante sua diferenciação. A metodologia empregada na identificação do tipo de progênie, na contagem do número de progênies poliembriônicas e na determinação da frequência do caráter nestas, subestimou os valores reais devido a competição entre os embriões não permitindo sua germinação. Desta forma não foi possível identificar-se um modelo genético que explique os dados obtidos. Entretanto, os resultados sugerem que o caráter poliembrionia em milho apresenta um aspecto qualitativo, referente à presença ou ausência de poliembrionia em progênies, sendo provavelmente controlado por um ou dois genes. Há também um aspecto quantitativo caracterizado pela presença de uma série de genes de efeito aditivo, que possivelmente controlam a frequência ou o grau de poliembrionia em progênies poliembriônicas.

STUDY OF THE POLYEMBRYONIC CHARACTERISTIC
IN MAIZE (*Zea mays* L.)

AUTHOR: Anete Pereira de Souza

ADVISER: Dr. José Roberto Mõro

SUMMARY

With the aim of assessing of phenotypic alterations promoted by and also the origin and the inheritance of the polyembryonic trait in maize, the following studies were carried out: 1- analysis of the oil content of mono - and polyembryonic seeds; 2- phenotypic evaluation of multiple plants during their development and 3- embryological and genetic studies in polyembryonic progenies. These were obtained by crossing the ESALQ-POLI-VD2 population, that is polyembryonic, with inbred lines that presented gene markers and did not show polyembryony.

The analysis of oil content was done by the NMR (Nuclear Magnetic Ressonance) procedure. The embryogenesis was studied through Clearing Squash Technique developed by HERR (1971). The inheritance of the polyembryonic character was analysed through the F_1 , F_2 , F_3 , backcross, S_1 , half-sib and full-sib progenies, obtained from multiple plants. The genetics analysis were carried through by counting multiple

plants present in the germination tests.

The results are indicative that there is no difference between oil content of mono-and polyembryonic seeds. The polyembryonic behavior is originated through the cleavage and cells proliferation in the proembryo, that appears during the differentiation stage. The methodology employed in identifying the progenie type, in counting the number of polyembryonic progenies and in determining the frequency of the trait in them, underestimated the real values. This was due to the competition among the embryos, not allowing, therefore, their germination. Thus it was not possible to identify a genetic model to explain these data.

Nevertheless the results suggest that the polyembryony trait in maize presents a qualitative aspect, referring to the presence or absence of polyembryony in progenies. It is probably controled by one or two genes. It also presents a quantitative aspect, characterized by the presence of a series of genes with aditive effect, that possibly control the frequency or the degree of polyembryony in polyembryonic progenies.

1. INTRODUÇÃO

A poliembrionia, ou ocorrência de mais de um embrião em um único óvulo, foi descoberta pela primeira vez no gênero *Cítrus* por Leeuwenhoek, em 1719, e desde então tem sido relatada em muitas espécies, por vários autores. Este fenômeno pode ocorrer em qualquer tipo de semente, variando intra e interespécies em frequência, origem e tipos fenotípicos observados.

Entre as angiospermas, excetuando-se as famílias Anacardiaceae, Betulaceae, Myrtaceae, Rosaceae e Rutaceae onde a poliembrionia é frequente, ela não é uma característica comum. Embora seja observada em um grande número de espécies, sua frequência de ocorrência é baixa.

Vários autores têm observado que a poliembrionia pode ter mais de uma origem, resultando de diferenciação de células do integumento ou nucelo em embriões, clivagem e pro-

liferação do zigoto, pró-embrião ou embrião, desenvolvimento partenogênico de uma ou mais células haplóides do saco em brionário, em adição a oosfera, presença de mais de uma oosfera em um mesmo saco embrionário ou existência de dois ou mais sa cos embrionários em um mesmo óvulo.

Tem-se observado que os processos que dão origem a sementes poliembriônicas, através do desenvolvimento de células haplóides do saco embrionário, resultando em plantas haplóides, ocorrem em várias espécies, inclusive em milho.

Atualmente, os haplóides em plantas têm despertado grande interesse entre os melhoristas, devido a possibi lidade de utilizá-los na obtenção de híbridos. Os haplóides, sendo duplicados, constituem-se em linhagens altamente homozi góticas que, em cruzamento com linhagens complementares, resul tam em híbridos heteróticos.

Entre as tecnologias desenvolvidas na busca de haplóides encontram-se a cultura de óvulos e anteras, cruzamentos interespecíficos, irradiação dos grãos de pólen, polinizações tardias, fusão interespecífica de protoplastos e técnicas de eliminação de cromossomos através de cruzamentos intergenéricos. Todos estes métodos são artificiais, apresen tando uma série de limitações.

O fato da poliembrionia poder ser uma fonte natu ral de haplóides tem incentivado o desenvolvimento de várias pes

.3.

quisas com o objetivo de identificar-se a origem e a herança deste caráter. Entretanto, algumas particularidades da poliembrionia tais como baixa frequência de ocorrência e variação nos tipos de plântulas múltiplas obtidas, têm dificultado estes estudos.

Em milho, além da possibilidade de obter-se haplóides, alguns autores observaram que as sementes poliembrionicas apresentavam maior teor de óleo e proteínas que as monoembriônicas, sendo também altamente prolíficas. Sugeriram então que a poliembrionia seria um caráter desejável em híbridos e variedades melhoradas para aumento do teor de óleo (PESEV & PETROVIC, 1976).

O surgimento deste caráter na população de milho Dentado Composto levou SILVA *et alii* (1971) a iniciar os estudos de origem e herança da poliembrionia nesta população.

Neste contexto, os objetivos do presente trabalho foram dar continuidade aos estudos iniciais, determinando a origem do caráter e, através dela, as possibilidades de obter-se haplóides, o valor das sementes para emprego em programas de melhoramento visando a elevação do teor de óleo e a identificação da herança do caráter.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Embriogênese em milho

Com a finalidade de tornar mais claras as discussões que se seguirão neste trabalho, serão feitas inicialmente, algumas considerações sobre a embriogênese em milho.

As informações apresentadas a seguir estão baseadas nos clássicos trabalhos de RANDOLPH (1936) e KIESSELBACH (1949), onde a embriogênese em milho foi detalhadamente estudada.

O milho apresenta um único saco embrionário em cada espiguetta feminina. No nucelo jovem, observa-se frequentemente uma fileira axial de células que termina em uma célula sub-epidermal, denominada de arquespório. Esta divide-se mitoticamente e aumenta de tamanho, diferenciando-se em célula-mãe do megásporo (CMM), que, por sua vez, divide-se meioticamente, originando quatro megásporos haplóides (KIESSELBACH, 1949).

.5.

Dos quatro megásporos formados, os três próximos à micrófila degeneram-se, sendo que o quarto persiste, transformando-se na primeira célula do saco embrionário. Esta sofre três divisões mitóticas, originando um saco embrionário octonucleado.

Três destes núcleos localizam-se na extremidade micropilar, originando duas sinérgidas e a oosfera, e outros dois localizam-se no centro do saco embrionário, formando dois núcleos polares. Os três restantes, movem-se para a extremidade chalázica, sofrem divisões mitóticas, originando um grupo de 20 a 40 células antipodais. O saco embrionário assim constituído (Figura 1) está pronto para ser fertilizado.

Figura 1 - Saco embrionário maduro. 250x.
(KIESSELBACH, 1949).

A fertilização pode ocorrer até 25 horas após a polinização, dependendo do comprimento do estilo-estigma e da temperatura ambiental (RANDOLPH, 1936).

Em milho ocorre dupla fertilização logo após o tubo polínico penetrar no saco embrionário. Esta é resultante da fusão da oosfera com o primeiro núcleo espermático e fusão dos núcleos polares com o segundo núcleo espermático do tubo polínico, logo após a penetração deste no saco embrionário. O zigoto sofre sua primeira divisão mitótica 10 a 12 horas após a fertilização, quando já existem de 4 a 32 núcleos livres de células do endosperma (RANDOLPH, 1936).

No período de 2 a 5 dias, após a polinização, há um aumento considerável do ovário sem ocorrer mudanças apreciáveis na sua forma, mas no período de 5 a 10 dias observa-se uma elongação pronunciada da cariopse jovem e um rápido crescimento do endosperma.

No estágio de 10 dias, o endosperma expande-se até ocupar cerca da metade do nucelo, contudo, o embrião permanece ainda relativamente pequeno. No período de 10 a 20 dias o aumento do endosperma ocorre a uma taxa maior que o crescimento do embrião. Nos períodos de 20 a 40 dias o crescimento do embrião é rápido, cessando por volta dos 45 dias.

2.1.1. Ontogenia do embrião em milho

O pró-embrião, formado pela divisão do zigoto, é constituído inicialmente de uma célula apical lenticular e

.7.

e uma célula basal três a quatro vezes maior que a primeira. Em condições de $25^{\circ} - 30^{\circ}\text{C}$, RANDOLPH (1936) observou que, 42 horas após a polinização, o pró-embrião apresenta-se com 5 a 6 células.

O crescimento do pró-embrião, neste período, ocorre através de divisões celulares que não seguem um padrão ordenado ou definido.

Durante o período de 4 a 8 dias após a polinização o crescimento do pró-embrião é intenso na região apical, onde ocorrem várias divisões celulares, enquanto que na região basal, elas são em menor número. Como resultado, observa-se a formação de uma estrutura claviforme (Figura 2).

Figura 2 - Pró-embriões nos estágios de 4 a 10 dias após a polinização, em seções longitudinal-radiais: A - 4 dias; B - 5 dias; C - 6 dias; D - 7 dias; E - 8 dias; F - 9 dias; G - 10 dias. A - E, 225X; F e G, 200x. (RANDOLPH, 1936).

.8.

Não observa-se nenhuma diferenciação no prô-em brião até o estágio de 8 dias. As divisões celulares ocorrem aleatoriamente, sem orientação definida das células filhas. No ta-se uma diminuição acentuada do tamanho das células, acompanhada pelo seu aumento rápido em número.

A diferenciação inicia-se entre 8 a 9 dias após a polinização (RANDOLPH, 1936; KIESSELBACH, 1949), progredindo rapidamente. Nesta etapa forma-se uma epiderme definitiva sobre a região apical, que progride gradualmente para a região ocupada pelo suspensor. A primeira diferenciação observada é a formação de paredes celulares anticlinais no tecido epidermial.

O eixo embrionário é observado pela primeira vez nos embriões com 9 a 10 dias após a polinização, através de um grupo de células localizadas na fase anterior, logo abaixo do ápice do embrião. A intensa divisão destas células provoca uma taxa de crescimento maior que das outras células do embrião, isto resulta no desenvolvimento de uma protuberância na face anterior.

Aos 13 dias, observa-se que o único grupo de células meristemáticas formadas diferenciam-se em dois grupos distintos: um superior, que refere-se aos primórdios da plúmula e um inferior, sendo o primórdio radicular (RANDOLPH, 1936).

Entre 13 e 14 dias há um crescimento acentuado

do suspensor e do escutelo (Figura 3, C-D). Durante o período de 14 a 20 dias aparecem o coleoptile e os primórdios foliares (Figura 3, D-H). O coleoptilo desenvolve-se rapidamente, assumindo a forma de uma estrutura de revestimento que envolve os primórdios foliares.

A primeira folha aparece abaixo do ponto meristemático, em direção oposta ao primórdio do coleoptile. A segunda folha aparece acima do ponto meristemático, em posição exatamente oposta à primeira folha (Figura 3, H).

As folhas continuam a formar-se durante o período de 25 a 45 dias após a polinização. Neste período a radícula revestida pela coleorriza, diferencia-se totalmente (Figura 3, I-K). Em geral, a cariópse de milho torna-se morfológicamente madura, entre 45 e 50 dias após a polinização.

2.2. Poliembrionia

Poliembrionia, ou ocorrência de mais de um embrião em uma semente, foi primeiramente descoberta por Leeuwenhoek, em 1719, quando observou que sementes de laranja continham dois ou mais embriões (WARDLAM, 1955).

Desde sua descoberta, a poliembrionia tem sido relatada em diversas espécies, gêneros e famílias de angiosperma. Tem-se observado que este fenômeno pode ocorrer em qual-

Figura 3 - Embriões em secções longitudinal-radiais, no estágio de 10 a 45 dias após a polinização: A - D, estágios de 10, 12, 13 e 14 dias; E - H, estágios de 14, 16, 18 e 20 dias (C - Coleóptile, l_1 e l_2 - primórdios da primeira e segunda folha da plântula); I - K, estágios de 25, 35 e 45 dias após a polinização. A - D, 60x; E - H, 25x; I - K, 12x. (RANDOLPH, 1936).

quer tipo de semente, variando em frequência, intra e interespecificamente (COOPER, 1940; RANDALL & RICH, 1943; MORGAN JUNIOR & RAPPLEYE, 1954 e MURRAY, 1980, entre outros).

Embora a poliembrionia seja bastante disseminada entre as angiospermas, a sua frequência de ocorrência é muito baixa.

Entre os vários exemplos existentes na literatura, pode-se citar as frequências de 0,1 a 2,5% de poliembrionia em *Allium cepa* e 0,44% em *Solanum melongena* (VARSHANI, 1974 e 1979), 0,19% de sementes com 2 a 4 embriões em *Thea sinensis* (KUTUBIDZE, 1975), 0,14% em *Brassica napus* (SHNAIDER & SIL'VERE, 1975), 0,0012 em *Cucumis sativus* (TURKOV *et alii*, 1974) e 0,0002 a 0,2% em variedades de *Triticum aestivum* (BORISENKO *et alii*, 1977).

A expressão do fenômeno também apresenta variações quanto ao fenótipo e número de plantas múltiplas produzidas a partir de uma semente. O número de embriões pode variar de 2 a 6, em espécies onde a poliembrionia é de ocorrência restrita, como por exemplo entre as gramíneas, ou chegar a 45 em espécies de *Citrus*, onde este caráter é normalmente encontrado (PARLEVLIET & CAMERON, 1959).

As plantas múltiplas podem ser completamente separadas, apresentando parte aérea e radicular individuais

ou possuir porções unidas como por exemplo, duas plúmulas e um único sistema radicular. Estes dois tipos podem ocorrer combinados, isto é, uma das plantas é separada e completa enquanto que as outras, da mesma semente, apresentam partes unidas (CAMERON, 1949; MORGAN JUNIOR & RAPPLEYE, 1950; ENDRIZZI, 1959; THÉVENIN, 1968; CHEN *et alii*, 1985, entre outros).

As plantas separadas podem ser idênticas ou variar em tamanho e/ou presença de genes marcadores, geralmente aqueles ligados à coloração de folhas, flores ou frutos.

A maior parte dos autores consultados tem observado uma heterogeneidade na ploidia das plantas múltiplas, principalmente naquelas completamente separadas. Têm sido encontradas plantas haplóides, diplóides, triplóides, tetraplóides e aneuplóides, em várias combinações, sendo diplóide-diplóide a mais freqüente.

Estas variações em número, fenótipo e ploidia ocorrem simultaneamente em uma mesma população analisada, tendo sido encontradas em *Capsicum annuum* (CHRISTENSEN & BAMFORD, 1943), *C. frutescens* (MORGAN JUNIOR & RAPPLEYE, 1950 e 1954), várias espécies dos gêneros *Lilium* e *Nicotiana* (COOPER, 1940), *Nicotiana tabacum* (CAMERON, 1949), *Linum usitatissimum* (THOMPSON, 1977; MURRAY, 1980), várias espécies do gênero *Gossypium* (WEBBER, 1938; SILOW & STEPHENS, 1944; ENDRIZZI, 1959), *Asparagus offici-*
*nal*is (RANDALL & RICK, 1945; THÉVENIN, 1968), *Solanum tube-*

rosum (FRANDSEN, 1968), *Glycine max* (KENWORTHY *et alii*, 1973 e BEVERSDORF & BINGHAM, 1977), *Oryza sativa* (RAMIAH, 1935), *Pennisetum americanum* (POWELL *et alii*, 1975), *Pennisetum typhoides* (POWELL & BURTON, 1968), *Avena sativa* (NISHIYAMA *et alii*, 1968), *Triticum aestivum* (WILSON & ROSS, 1961), *Tripsacum dactyloides* (FARQUHARSON, 1955) e *Zea mays* (KIESSELBACH, 1926; RANDOLPH, 1936; MORGAN JUNIOR & RAPPLEYE, 1951; JUDIN & HVATOVA, 1966; SARKAR & COE, 1966; KERMICLE, 1971; SILVA *et alii*, 1971 e PESEV & PETROVIC, 1976), entre outros.

Em vista da grande complexidade de expressão do caráter poliembrionia, aliada à baixa frequência de ocorrência na maioria das angiospermas, os estudos realizados por diversos autores têm apontado inúmeras hipóteses para explicar a origem e a herança deste caráter. Em muitas espécies foi proposto mais de uma origem do fenômeno para uma mesma população estudada.

WEBBER (1940) propôs uma classificação dos tipos de poliembrionia relatados até aquela época, sendo esta adotada em parte por MAHESHWARI (1950) e WARDLAW (1955). Esta classificação dos diferentes tipos de poliembrionia foi efetuada, considerando-se a origem dos embriões múltiplos. Desta forma a poliembrionia foi dividida em cinco tipos:

a) *Poliembrionia esporofítica* (ou *embrionia adventicea*): os embriões esporofíticos são produzidos, a par-

tir de células diferenciadas do integumento ou nucelo. Estes embriões metromórficos competem com o embrião gamético, podendo, em alguns casos, substituí-lo.

Tem-se encontrado este tipo de poliembrionia entre gêneros das famílias Anacardiaceae, Betulaceae, Myrtaceae, Rosaceae e Rutaceae, sendo os gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Potentilla* os exemplos mais estudados.

b) Poliembrionia por clivagem do zigoto: refere-se à separação do zigoto ou pró-embrião em duas ou mais unidades, cada qual dando origem a um embrião. Em alguns gêneros os embriões adicionais são formados através da proliferação do pró-embrião ou a partir da diferenciação de células, tais como as do suspensor.

Este tipo de poliembrionia é muito comum entre as gimnospermas, porém tem sido encontrado, embora mais raramente, entre as angiospermas. Nesta últimas, os embriões adicionais geralmente originam-se de uma mesma porção do pró-embrião, como nas gimnospermas, entretanto, eles derivam-se com mais frequência a partir de proliferação que através de divisões do zigoto.

Como todos os embriões são monozigóticos em origem, eles resultam em plantas idênticas entre si.

Entre os vários exemplos citados na literatura, alguns referem-se a fumo, soja, milho, *C. frutescens* e

G. hirsutum.

c) *Poliembrionia simples*: refere-se ao desenvolvimento de várias oosferas a partir de um único megásporo. Estas unem-se a micrôsporos originando vários embriões sexuais, diferentes entre si, dentro de um único saco embrionário.

A poliembrionia simples ocorre predominantemente entre as gimnospermas e como este tipo de saco embrionário não é encontrado entre as angiospermas, acredita-se que a poliembrionia simples não seja comum nesta subdivisão.

d) *Poliembrionia euplóide*: sob esta denominação, WEBBER (1940) incluiu todos os processos que levam à formação de embriões múltiplos que apresentam ploidias diferentes entre si e/ou da espécie. Entretanto casos de plantas múltiplas diplóide-diplóide, que não podem ser classificados em nenhum dos outros três tipos de poliembrionia, são enquadrados aqui.

Entre os principais processos citados encontram-se:

- desenvolvimento partenogênico de uma ou mais células haplóides do saco embrionário (*antipodas* ou *sinérgidas*), antes, durante ou após a primeira divisão do zigoto;

- ocorrência de sacos embrionários contendo oosferas não reduzidas que sofrem fertilização, originando triplóides;
- duplicação somática do zigoto adicional que faz parte de um segundo saco embrionário, dando origem a plantas tetraplóides.

Segundo MAHESHWARI (1950), os sacos embrionários adicionais podem originar-se a partir de uma, duas ou mais células mãe do megásporo, ou a partir do nucelo e, neste último caso, seria uma aposporia.

Em situações onde um dos sacos embrionários não é reduzido e desenvolve-se partenogenicamente, têm-se poliembrionia resultante de apomixia.

A literatura contém muitos exemplos de poliembrionia euplóide, que serão discutidos posteriormente.

e) *Falsa poliembrionia*: definiu-se poliembrionia como sendo a ocorrência de mais de um embrião em um mesmo óvulo. Assim, casos onde uma semente contém dois embriões resultantes de óvulos diferentes, intimamente justaposto, possuindo, cada um, micrópila e funículo, são considerados por WEBBER (1940), como falsa poliembrionia.

Embora na literatura existam opiniões confl

tantes com relação a esta definição, normalmente os autores salientam a diferença entre verdadeira e falsa poliembrionia. Em várias espécies de *Coffea* (MENDES, 1944 e VISHVESHWARA & CHINNAPPA, 1965), *C. aquatica* (RAO & VENKATESWARLU, 1976), pimenta (MORGAN JUNIOR & RAPPLEYE, 1954) e milho (KIESSELBACH, 1926) detectou-se falsa poliembrionia.

Entre os diferentes tipos de poliembrionia, os que mais tem despertado o interesse dos geneticistas e melhoristas, são aqueles classificados como poliembrionia eu-plóide, por originarem plantas haplóides.

Em praticamente todas as espécies de angiospermas onde a poliembrionia não é comum, os haplóides encontrados geralmente estão associados ao surgimento de plantas múltiplas.

Vários autores (COOPER, 1940; CHRISTENSEN & BAMFORD, 1943; RANDALL & RICK, 1945; THEVENIN, 1968; MURRAY, 1980 e GOLOVIN, 1982, entre outros) tem considerado este tipo de poliembrionia, como uma fonte natural de haplóides. Neste caso, a determinação do modo de herança e da origem exata deste caráter é de grande importância para o melhoramento das plantas onde ele ocorre.

Os haplóides obtidos através de plantas poliembrionicas poderiam ser duplicados, constituindo-se em linhagens altamente homozigóticas, a serem empregadas em progra

mas de obtenção de híbridos.

São citados na literatura relatos de quatro programas de obtenção de híbridos empregando linhagens originadas de haplóides duplicados, selecionados de plantas múltiplas: milho (GOLOVIN, 1982); aspargo (THÉVENIN, 1968); linho (MURRAY, 1980) e pimenta (MORGAN JUNIOR & RAPPLEYE, 1954).

2.2.1. Poliembrionia em Monocotiledôneas

Entre as monocotiledôneas, as famílias Gramineae e Liliaceae são as mais estudadas quanto à frequência e origem do caráter poliembrionia.

Atualmente, está bem estabelecido que a poliembrionia é um caráter herdável que pode ser selecionado. Embora ocorra naturalmente em frequência baixa, esta pode ser aumentada nas gerações precedentes através de cruzamentos controlados.

No trabalho desenvolvido por PESEV & PETROVIC (1976), onde foram obtidas 10 gerações de linhagens endogâmicas de milho que apresentavam poliembrionia, foi observado um aumento na expressão do caráter oito vezes superior à média inicial. Entre as linhagens utilizadas houve algumas onde este aumento foi relativamente superior, indicando a existência de variabilidade para a frequência do caráter.

Também em milho, SILVA *et alii* (1971) encontraram frequência de 0,00192% de plantas múltiplas em 19.200 sementes da população original. Após dois ciclos de seleção e autofecundação das plantas múltiplas, esta frequência aumentou para 0,0759%.

Análises de progênies de *C. aquatica* (RAO e VENKATESWARLU, 1976), *Bromus inermis* (ZHELEZNOV *et alii*, 1980), *P. typhoides* (POWELL & BURTON, 1968), *P. americanum* (POWELL *et alii*, 1975), várias coleções de *T. dactyloides* (FARQUHARSON, 1955), aspargo (THÉVENIN, 1968) e milho (SARKAR & COE, 1966 e PESEV & PETROVIC, 1976) quanto a frequência de poliembrionia, observaram que ela é dependente do "background" genético das plantas, podendo variar entre ecotipos e linhagens de uma mesma variedade.

Embora as plântulas múltiplas sejam de ocorrência natural entre as gramíneas e liliáceas, elas também podem ser obtidas a partir de culturas "*in vitro*" (SEHGAL, 1972) ou por tratamento com agentes mutagênicos.

Irradiando-se grãos de pólen de milho e *L. regale*, MORGAN JUNIOR & RAPPLEYE (1951) obtiveram aumentos na frequência de plantas múltiplas em ambas as espécies. Em milho observou-se a frequência de 16,67% na progênie obtida com pólen irradiado enquanto que o controle apresentou 0,12% de plantas múltiplas. Em *Lilium regale*, o controle apresentou 0,007%

e as progênes com pólen tratado, 0,336% de plantas múltiplas.

Os tipos fenotípicos observados em ambas as espécies foram divididos em quatro classes básicas: *duas plântulas separadas e aproximadamente iguais, duas plântulas separadas e diferindo muito em tamanho e vigor; duas plântulas apresentando partes unidas e três plântulas, sendo uma totalmente separada e as outras possuindo partes unidas.*

As contagens de cromossomos das plântulas múltiplas de milho revelaram que todas eram diplóides. Os autores sugerem que elas originaram-se através de clivagem do embrião.

Irradiações em pólen de arroz (BASU e BASU, 1974; MAJUMBER, 1974) e em pró-embriões e embriões de trigo (KRAEVOI *et alii*, 1977, e KRAEVOI & OKHRIMENKO, 1979), 1 a 5 dias após o florescimento da panícula, aumentaram a frequência de ocorrência de plântulas múltiplas.

O tratamento de grãos de trigo, *T. durum* e *Secale cereale* (BORISENKO, 1980) com etilenimina promoveu aumentos de 1,7 a 1,9 vezes na frequência de poliembrionia nas gerações seguintes. Os autores não fazem nenhuma referência quanto à origem da poliembrionia.

Estudos da origem das plântulas múltiplas em trigo têm sugerido que estas possuem mais de uma origem.

WILSON & ROSS (1961) encontraram uma frequência de 1 plântula múltipla em 3.200 sementes germinadas e um par diplóide-haplóide por 20 pares de plântulas. Os triplóides apareceram em maior frequência que os haplóides. BURKMAKINA (1980) também observou a ocorrência de pares diplóides-haplóides entre as plântulas múltiplas de trigo. Entretanto, BURKMAKINA & ZHELEZNOV (1978) analisando 7 diferentes variedades de trigo encontraram apenas pares diplóide-diplóide.

Desta forma, tem-se sugerido que os pares diplóide-diplóide, em trigo, poderiam originar-se a partir de dois sacos embrionários fertilizados ou de um saco embrionário onde, além da oosfera, uma das sinérgidas foi fertilizada. Nos pares diplóide-haplóide, o haplóide seria formado pelo desenvolvimento partenogênico da sinérgida e o diplóide por fertilização normal.

Em *A. sativa*, *A. byzantina* e *A. nuda* tem-se encontrado uma grande variação no número de cromossomos das plântulas múltiplas. NISHIYAMA *et alii* (1968) estudando estas três espécies observaram plântulas haplóides, diplóides, triplóides e aneuplóides, combinadas em pares com diplóides. Em *A. byzantina*, os pares diplóide-diplóide ocorreram em menor frequência que os pares de plântulas com número diferente de cromossomos. As hipóteses propostas pelos autores para explicar a origem destas plântulas incluem desenvolvimento partenogênico das sinérgidas, clivagem do zigoto, existência de duas oos

feras em um mesmo saco embrionário e desenvolvimento e fertilização de sacos embrionários não reduzidos.

Foram encontradas duas a três plântulas a partir de uma semente em arroz (RAMIAH *et alii*, 1935). Entre as linhagens e híbridos avaliados, uma linhagem foi particularmente eficiente na produção de plântulas múltiplas. Algumas sementes deram origem a uma plântula verde e uma albina, demonstrando que elas eram geneticamente diferentes. Embora não tenham sido realizados estudos embriológicos, através da análise genética das plântulas, os autores sugerem que as plântulas múltiplas originaram-se de dois sacos embrionários, de constituição genética diferente. Entre as várias plântulas múltiplas obtidas, algumas diplóides estavam associadas a haplóides.

Estudos realizados em progênies de *Sorghum bicolor* (ROSS & WILSON, 1969), resultantes de autofecundação e cruzamentos, demonstraram que a frequência de poliembrionia foi menor nas progênies endogâmicas. Embora não tenham sido realizadas contagens de cromossomos nas plântulas múltiplas, os autores acreditam que ocorreram pares diplóide-haplóide e haplóide-haplóide, pois em muitos casos, um ou ambos os membros do par eram extremamente fracos, morrendo nos estágios iniciais de seu desenvolvimento.

POPE (1943), analisando a embriogênese em *Hor-*

deum vulgare, variedade Manchuria, observou que em alguns ovários coletados 12 dias após a polinização havia dois embriões intimamente unidos, sendo um deles menor. As contagens de cromossomos das plantas múltiplas demonstraram que todos eram diplóides. O autor sugeriu que a poliembrionia ocorreu devido a clivagem do zigoto.

DEWEY (1964) realizou um estudo detalhado em 14 espécies do gênero *Agropyron*. Mais de um milhão de sementes foram germinadas e as plântulas múltiplas foram selecionadas e avaliadas quanto ao fenótipo e número de cromossomos. O autor concluiu que há variação intra e interespecífica na produção de plântulas múltiplas. O fenótipo destas plântulas variou quanto ao tamanho, grau de união e número de plântulas por semente. DEWEY (1964) atribuiu à poliembrionia, a capacidade de gerar desvios euplóides do número de cromossomos normal da espécie. Sugeriu então que devido a esta característica, a poliembrionia pode ter contribuído significativamente na evolução, produzindo variantes citológicos, especialmente poliplóides. Dois mecanismos são propostos para explicar a origem das plântulas múltiplas: *clivagem do pró-embrião e desenvolvimento partenogênico de uma célula reduzida do gametófito feminino*.

Em *P. typhoides* (POWELL & BURTON, 1968) e *P. americanum* (POWELL *et alii*, 1975) observou-se a mesma varia-

ção, entretanto na última espécie o número de variantes citológicos foi muito pequeno.

Em *Lolium perenne* encontraram-se entre as plantas múltiplas membros haplóides, triplóides e tetraplóides e em *Festuca pratensis* observaram-se triplóides, tetraplóides e pentaplóides. Em ambas as espécies os triplóides foram os mais frequentes. Os autores não fizeram suposições sobre a origem destas plântulas (SULINOWSKIS *et alii*, 1984). Já em *B. inermis* (ZHELEZNOV *et alii*, 1980), *Poa palustris* e *P. nemoralis* (TERZIISKI & KHRISTOV, 1983) foram encontrados principalmente pares diplóide-diplóide. Na análise de 22 variedades de *B. inermis*, observou-se uma única plântula haplóide em 200 pares diplóide-diplóide. Neste caso sugeriu-se que a poliembrião é resultante do desenvolvimento de dois sacos embriônicos. Estudos embrionários das duas espécies de *Poa* indicaram que os embriões adicionais originaram-se através de aposporia e diplosporia.

Em aspargo também foi observado uma variação intraespecífica quanto à frequência de poliembrião e frequência de haplóides em plântulas múltiplas, embora os pares diplóide-diplóide tenham representado a maioria dos casos em todas as variedades estudadas.

RANDALL & RICK (1945) e THÉVENIN (1968) estudaram detalhadamente a frequência, fenótipo e ploidia das plan-

tas múltiplas de aspargo. A ocorrência de haplóides, aneuplóides e triplóides em associação com diplóides, bem como o surgimento de plântulas diplóides parcialmente unidas, levaram os autores a concluir que as plantas haplóides originaram-se através do desenvolvimento partenogênico de células haplóides do saco embrionário. As plântulas diplóide-diplóide parcialmente unidas seriam resultantes de clivagem do pró-embrião. Quanto aos triplóides, nenhuma hipótese foi formulada.

Na tribo *Maydeae* tem-se observado poliembrionia tanto nos gêneros da América como da Ásia. Os estudos em briológicos realizados em *Chionachne koenigi* (KOUL, 1970) tem demonstrado uma frequência de 20% de sacos embrionários gêmeos, resultantes de divisões reducionais normais. Em *C. aquatica* RAO & VENKATESWARLU (1976) observaram, através de estudos genéticos, que as plântulas múltiplas originaram-se também a partir de dois sacos embrionários normais. Alguns casos de plântulas múltiplas foram considerados como falsa poliembria.

FARQUHARSON (1955), analisou 49 introduções de *Tripsacum dactyloides*, denominadas por ela de tetraplóides, embora tivesse observado variações no número de cromossomos, de 36 a 108, sendo $x = 18$. Observou que houve variação na frequência de poliembria dependendo da ploidia das plan-

tas produtoras das sementes. Os tetraplóides ($2n = 72$) produziram aproximadamente 50% de sementes poliembrionicas, enquanto que nos diplóides ($2n = 36$) não foi observada poliembrionia.

As plântulas múltiplas obtidas variaram em tamanho, ploidia e número de plântulas por semente. Devido a ocorrência de apomixia nesta espécie, esta variação não era esperada.

Estudos embriológicos indicaram que o embrião adicional originou-se a partir do desenvolvimento partenogênico de células haplóides (provavelmente a sinérgida) de um ou mais sacos embrionários. Também foi observado que em 14 a 18% dos óvulos analisados havia dois sacos embrionários originados a partir de duas células mãe do megásporo.

Em progênies apomíticas de milho - *Tripsacum*, observou-se poliembrionia (FOKINA, 1980). Através de análises citogenéticas foram observadas progênies diplóides com 56 cromossomos (20 do milho + 36 do *Tripsacum*) e diplóides com 38 cromossomos (20 do milho + 18 do *Tripsacum*) que apresentavam plântulas múltiplas. O autor associou poliembrionia a apomixia, entretanto não esclareceu o motivo desta associação nem a origem das plântulas múltiplas.

Vários autores têm observado plântulas múltiplas entre sementes de milho. Entretanto, o tipo de plântu-

la e a hipótese sugerida para explicar sua origem, têm diferido muito entre tais autores.

KIESSELBACH (1926) observou plântulas múltiplas de milho que apresentavam partes unidas. Estas foram levadas para o campo, onde observou-se que elas eram idênticas quanto aos caracteres morfológicos de colmo, folhas, formato de espiga e sementes produzidas. Em duas gerações de autofecundação, não foi obtida nenhuma outra plântula múltipla. O autor considerou que o caráter não era herdável, e denominou-o de falsa poliembrionia. Entretanto, as figuras apresentadas em seu trabalho e a descrição das plântulas correspondem exatamente às aquelas apresentadas por MORGAN JUNIOR & RAPPLEYE (1951) e SILVA *et alii* (1971) que classificaram-nas como resultantes de poliembrionia por clivagem do embrião.

Este mesmo tipo de plântulas múltiplas foi descrita por RANDOLPH (1936). Este autor relata que em algumas variedades de milho encontraram-se esporadicamente, sementes apresentando dois embriões situados lado a lado. A frequência de ocorrência destas sementes aumentava acentuadamente quando o material era tratado com raio X. RANDOLPH (1936) sugeriu que os embriões provavelmente originaram-se a partir de um único saco embrionário, pois não foi observada nenhuma evidência de duplicação do endosperma ou pericarpo. Além disso, como estas plântulas geralmente eram geneticamente idên-

ticas, mesmo em variedades extremamente heterozigóticas, o autor sugeriu que elas seriam resultantes de um único zigoto, provavelmente por subdivisão do embrião em estágios precoces de sua ontogenia. Dependendo do momento em que estas subdivisões ocorressem, poderiam originar-se plântulas completamente separadas ou apresentando partes unidas.

Também têm sido encontradas plântulas múltiplas, em milho, que apresentam variações no número de cromossomos. JUDIN & HVATOVA (1966 e 1970) observaram duas a três plântulas a partir de uma semente, onde, em poucos casos, surgiram haplóides e triplóides. Todos os haplóides eram maternos, sendo resultante de partenogênese.

No Instituto de Investigaciones Agropecuárias (1965), Santiago, observaram-se 6 plântulas múltiplas de milho, sendo 3 pares diplóide-haplóide, 1 par diplóide-triplóide e dois pares onde um dos membros era haplóide e o outro indeterminado.

ZVERZHANSKAYA *et alii* (1977) estudaram 524 sacos embrionários de duas linhagens l_3 de milho, obtidas a partir de um haplóide do híbrido Bukovina 3. Os autores observaram que 51% dos sacos embrionários continham duas ou mais oosferas em adição às 2 sinérgidas. Em 13,5% dos sacos embrionários observaram desenvolvimento partenogênico de embriões bicelulares ou multicelulares. Observaram também que as linhagens

estudadas produziram plantas haplóides e diplóides. Estes fatos levaram ZVERZHANSKAYA *et alii* (1977) a concluir que a poliembrionia, nestas linhagens, é resultante da presença de oosferas adicionais e que os haplóides desenvolveram-se a partir de divisões de oosferas não fertilizadas.

Os mesmos autores, em 1982, analisaram 2.200 sacos embrionários não fertilizados de duas linhagens 14-15 obtidas a partir de haplóides do híbrido Bukovina 3. Da mesma forma, foi observado desenvolvimento partenogênico de uma a duas oosferas por saco embrionário, cinco a oito dias após o início do florescimento. A presença de oosferas extras resultou na presença de grãos poliembriônicos nestas linhagens.

TYRNOV & ENALEENA (1984) encontraram 80% de haplóides monoembriônicos e poliembriônicos na linhagem AT1, quando a polinização foi atrasada por 7 a 10 dias. Esta linhagem derivou-se de progênies autofecundadas do cruzamento Stooch 6 X Korichnevyi Tester, na qual a frequência de partenogênese haplóide pode chegar a 100% e a endospermogênese autônoma, a não menos que 50%.

A linhagem Stooch 6 foi desenvolvida por COE (1959), sendo considerada uma excelente fonte de haplóides. Nesta linhagem foi observada a ocorrência de poliembrionia onde 65,3% dos pares eram diplóide-diplóide, 30,6% haplóide-haplóide e 4,1% diplóide-haplóide (SARKAR & COE, 1966). Através

de testes genéticos constatou-se que todos os haplóides eram maternos, e os diplóides, híbridos perfeitos.

Os autores observaram que a linhagem Stooock 6 apresentou uma alta frequência de dois tubos polínicos por grãos de pólen germinados e também alta frequência de hetero fertilização. POGNA & MARZETTI (1977) identificaram distribuição anormal do número de núcleos em tubos polínicos duplos de Stooock 6. Em 20% dos casos, havia 2 núcleos em um dos tu bos e apenas 1 no outro.

Isto sugere que a germinação anormal dos grãos de pólen possa ter influência na indução de haplóides maternos, devido à fertilização incompleta.

Embora tenham sido utilizados marcadores genéticos para identificação da origem das plântulas múltiplas em Stooock 6, SARKAR & COE (1966) não conseguiram saber se os pares haplóide-haplóide resultaram de uma clivagem precoce do embrião haplóide ou do desenvolvimento partenogênico simultâneo de duas células haplóides. Concluíram também que os pa res diplóide-haplóide podem ter se originado a partir do desenvolvimento partenogênico de uma das sinérgidas e fertilização normal da oosfera.

O grande interesse em obter-se haplóides em mi lho é devido à possibilidade de utilizá-los na obtenção de híbridos. Os haplóides sendo duplicados constituem-se em linha

gens altamente homozigotas que, em cruzamento com linhagens complementares, resultam em híbridos heteróticos.

Neste contexto, GOLOVIN (1982), estudando a eficácia do uso de haplóides no melhoramento para heterose, obteve um híbrido de milho, empregando linhagens obtidas a partir de haplóides. Os haplóides foram obtidos de sementes poliembriônicas e identificados através de marcadores genéticos. O híbrido mostrou-se bastante produtivo, com elevado teor de proteína nas sementes e resistente a doenças e ao acamamento. Entretanto, na referência consultada, o autor não forneceu nenhuma informação adicional sobre a eficiência da metodologia empregada, genes marcadores utilizados e produção do híbrido.

KERMICLE (1971) encontrou plântulas múltiplas entre progênes de milho que apresentavam o gene "*gametófito indeterminado*" (*ig ig*). Este gene provoca uma série de alterações nas sementes, e entre elas KERMICLE (1971) cita a poliembrionia. Através do emprego de marcadores genéticos, o autor concluiu que a poliembrionia é devido à ocorrência de dois sacos embrionários, que são polinizados independentemente.

Várias linhagens de milho foram obtidas por PESEV & PETROVIC (1976) durante 10 gerações de autofecundação, a partir de uma população composta por linhagens que apresentem

tavam de 0,4 a 8,2% de poliembrionia. As linhagens finais apresentaram de 2,1 a 25,3% de poliembrionia. Análises citológicas de 200 pares de plântulas demonstraram que todas eram diplóides.

As sementes poliembrionicas foram 3,2% maiores e apresentaram um aumento de 3,5 - 13,6% no teor de óleo e 4,0 - 6,0% no teor de proteína, em relação as sementes monoembriônicas da mesma linhagem. Entretanto o tipo de semente considerada como poliembrionica por PESEV & PETROVIC (1976), ou seja, sementes apresentando embriões em lados opostos, foram consideradas por RANDOLPH (1936) como grãos duplos.

Estes grãos são resultantes do desenvolvimento de ambas as flores (superior e inferior) da espiguetta feminina, enquanto que em espigas normais, apenas a flor superior desenvolve-se até a maturidade. O grau de união entre as duas flores pode variar desde totalmente separadas até completamente unidas, possuindo o pericarpo em comum.

RANDOLPH (1936) relata que este tipo de grão foi primeiramente observado por Kempton, em 1913, no milho Hopi e em um híbrido entre certas variedades chinesas e centroamericanas. Estes grãos duplos são estruturas compostas, com embriões em lados opostos e não podem ser confundidos com grãos simples, que possuem embriões pareados, localizados lado a lado, em uma mesma face da semente.

2.2.2. Poliembrionia em Dicotiledôneas

A poliembrionia tem sido observada em várias famílias e gêneros da classe Dicotyledoneae. Na Tabela 1 estão relacionadas algumas espécies onde este caráter tem sido mais estudado.

Para todas as espécies, existem diferentes hipóteses formuladas para explicar a origem da poliembrionia, com exceção daquelas do gênero *Citrus*, onde sabe-se que o fenômeno é resultante de embrionia adventícia.

A expressão da poliembrionia quanto a frequência, fenótipo e ploidia das plântulas múltiplas tem sido essencialmente a mesma observada em monocotiledôneas. O fato tem levado os autores a proporem as mesmas hipóteses apresentadas no ítem 2.2.1.

Uma particularidade observada em dicotiledôneas é a ocorrência de sementes poliembriônicas em progênes resultantes de cruzamentos interespecíficos (WEBBER, 1938; ENDRIZZI, 1959 e FRANDSEN, 1968). Isto levou WEBBER (1938) a sugerir que a poliembrionia seria um caráter primitivo, presente em espécies onde não havia harmonia gênica. Ele exemplifica sua hipótese citando a poliembrionia encontrada em espécies americanas de algodão, que são provavelmente alopolíplóides.

Tabela 1 - Dicotiledôneas que apresentam poliembrionia.

ESPÉCIE	REFERÊNCIA
<i>Capsicum annum</i>	CHRISTENSEN & BAMFORD (1943).
<i>Capsicum frutescens</i>	MORGAN JUNIOR & RAPPLEYE (1950 e 1954).
<i>Citrus</i> spp.	PARLEVLIET & CAMERON (1959); IWAMASA, UENO & NISHIURA (1967); CAMERON & SOOST (1979).
<i>Coffea arabica</i>	MENDES (1944); VISHVESHWARA & CHINNAPPA (1965).
<i>Coffea canephora</i> <i>Coffea excelsa</i> <i>Coffea liberica</i> <i>Coffea arabica</i> X <i>C. canephora</i>	MENDES (1944).
<i>Glycine max</i>	OWEN (1922); KENWORTHY, BRIM & WERNSMAN (1973); AHMAD, BRITTEN & BYTH (1977); BEVERSDORF & BINGHAN (1977); CHEN, HEER & PALMER (1985).
<i>Gossypium arboreum</i>	SILOW & STEPHENS (1944); ENDRIZZI (1959).
<i>Gossypium barbadense</i>	WEBBER (1938).
<i>Gossypium herbaceum</i>	SILOW & STEPHENS (1944); ENDRIZZI (1959).
<i>Gossypium hirsutum</i>	WEBBER (1938); ENDRIZZI (1959).
<i>Gossypium thurberi</i> <i>Gossypium hirsutum</i> X <i>G. barbadense</i>	ENDRIZZI (1959).
<i>Gossypium nanking</i> X <i>G. thurberi</i>	WEBBER (1938).
<i>Linum usitatissimum</i>	THOMPSON (1977); MURRAY (1980).
<i>Lycopersicon esculentum</i>	MARSHALL (1958); FOSKETT (1960).
<i>Nicotiana glutinosa</i> <i>Nicotiana rustica</i>	COOPER (1943).
<i>Nicotiana tabacum</i>	COOPER (1943); CAMERON (1946).
<i>Solanum tuberosum</i>	YOUNG (1922).
<i>Solanum tuberosum</i> (2x) X <i>S. phureja</i> <i>Solanum tuberosum</i> (4x) X <i>S. phureja</i>	FRANDSEN (1968).

2.3. Herança do Caráter Poliembrionia

As várias informações obtidas através do estudo da poliembrionia em diferentes espécies de plantas, demonstram que este caráter é complexo. Além dele expressar-se sob diversas formas, podendo ter origem diferente em uma mesma progênie, a sua frequência de ocorrência é baixa.

THOMPSON (1977) afirma que a baixa frequência de plantas múltiplas em linha é resultante das pressões de seleção natural contra o aparecimento destas plantas. Entretanto sua frequência poderia ser aumentada através de seleção para poliembrionia. A maior parte dos autores observou que o caráter é influenciado pelo ambiente, sendo que a porcentagem de plantas múltiplas depende do vigor da planta produtora das sementes e das condições ambientais sob as quais ela foi cultivada.

Devido à competição entre os vários embriões de uma semente durante a germinação, o número por sementes e a frequência de ocorrência de plantas múltiplas também são afetados pelas condições ambientais nesta fase.

Assim, a primeira dificuldade que surge no estudo da herança da poliembrionia é o emprego de uma metodologia adequada para avaliar a frequência de ocorrência do caráter. Com exceção dos estudos de poliembrionia em espécies

de *Citrus*, todos os autores consultados empregaram o teste de germinação em germinador ou em casa de vegetação, no estudo da frequência de plântulas múltiplas.

As análises embriológicas foram efetuadas apenas quando o objetivo era estudar a origem da poliembrionia. A técnica empregada nessa análise envolve inclusão dos óvulos em parafina, cortes em micrótomo, coloração dos filmes obtidos e observação em microscópio ótico, sendo, portanto, bastante trabalhosa.

Muitos autores, embora conhecendo as limitações da análise em testes de germinação, empregaram-no devido ao grande número de sementes que era necessário avaliar. MORGAN JUNIOR & RAPPEYE (1954), afirmaram que análises histológicas seriam impraticáveis, se não impossíveis de serem realizadas, no estudo da frequência de poliembrionia.

Em alguns gêneros, como por exemplo *Citrus*, *Poncirus* e *Coffea*, características das sementes tais como tamanho e facilidade em retirar-se o tegumento, permitem que a avaliação da frequência de poliembrionia seja realizada através de dissecações (MENDES, 1944, PARLEVLIET & CAMERON, 1959 e IWAMASA *et alii*, 1967).

Outro problema encontrado no estudo do caráter poliembrionia é o fato das plantas múltiplas de uma mesma progênie apresentarem diferentes origens e ploidias. Como mu

tas vezes, o estudo da herança deste caráter é realizado empregando-se genes marcadores (MORGAN JUNIOR & RAPPLEYE, 1954; MARSHALL, 1958; FOSKETT, 1960, entre outros), os resultados da frequência fenotípica tornam-se difíceis de ser explicados, levando os autores a proporem várias hipóteses diferentes.

Problemas semelhantes foram encontrados no estudo da base genética da apomixia, por exemplo, STEBBINS (1950) sugeriu que a herança da apomixia deveria ser complexa, mas estudos realizados posteriormente (TALIAFERRO & BASHAW, 1966; SAVIDAN, 1982) demonstraram que ela é controlada por um ou poucos genes.

Da mesma forma que em progênies que apresentam poliembrionia, as progênies apomíticas de várias espécies, mostram, geralmente, uma porcentagem variável de plantas sexuadas. Estas progênies são denominadas de apomíticos facultativos.

SAVIDAN (1981, 1982) estudando a origem e herança da apomixia em *Panicum maximum*, analisou os dados obtidos em duas etapas. Inicialmente estudou a herança da aposporia, através da presença ou ausência de sacos embrionários com quatro núcleos e na segunda etapa, estudou a herança do total de sexualidade em apomíticos facultativos.

Desta forma o autor eliminou um dos principais

problemas encontrados no estudo da apomixia. A apomixia, como a poliembria, é do tipo presente ou ausente, o que é um comportamento geral de caracteres qualitativos. Porém, a sua frequência de ocorrência assemelha-se àquela de caracteres quantitativos.

Através da análise de uma série de híbridos F_1 e retrocruzamentos envolvendo os cruzamentos de progênes sexuais e apomíticas, SAVIDAN (1982) concluiu que a apomixia em *P. maximum* é controlada geneticamente por um gene A, dominante sobre a sexualidade. Entretanto, o total de sexualidade residual, ou potencial de sexualidade em apomíticos facultativos, é um caráter de natureza quantitativa, onde a herança é muito complexa.

No gênero *Citrus* PARLEVLIET & CAMERON (1959) observaram que havia variação na frequência de sementes poliembriônicas por árvore e também, no número de embriões por semente. Eles estudaram a herança da poliembria empregando o procedimento que foi adotado por SAVIDAN (1982), quanto à análise das progênes obtidas. PARLEVLIET & CAMERON (1959) concluíram que a poliembria em *Citrus* spp. é controlada por um gene P, dominante sobre a monoembria. Entretanto, o grau de poliembria é controlado por uma série de genes, sendo, portanto, um caráter quantitativo.

CAMERON & SOOST (1979) fizeram novos estudos

sobre a herança do caráter poliembrionia em *Citrus* spp. Vários cruzamentos foram novamente efetuados, e as progênes resultantes analisadas. Os resultados obtidos diferiram daqueles apresentados por PARLEVLIET & CAMERON (1959). Os autores sugeriram um novo modelo genético no qual, a poliembrionia seria controlada por dois genes complementares dominantes P_1 e P_2 , onde os indivíduos monoembriônicos seriam $P_1_ p_2p_2$, $p_1p_1 P_2_$ ou $p_1p_1 p_2p_2$.

Na literatura existe também um exemplo de apomixia sendo controlada por dois genes. TALIAFERRO & BASHAW (1966), observaram que a apomixia em *Pennisetum ciliare* era controlada por dois genes, A e B. O gene B condiciona a sexualidade sendo epistático em relação ao gene A, que condiciona apomixia. Portanto, as plantas heterozigotas para os dois genes, quando autofecundadas, apresentaram a segregação 13 sexuais: 3 apomíticos.

Excetuando-se a poliembrionia observada no gênero *Citrus*, para a qual existem propostas de modelos genéticos com um ou dois genes responsáveis pelo controle do caráter, não existe uma explicação genética clara para os outros tipos de poliembrionia observados.

Alguns autores têm sugerido que o caráter é quantitativo (DEWEY, 1964; THÉVENIN, 1968 e THOMPSON, 1977). RAO & VENKATESWARLU (1976) concluíram que a poliembrionia em

C. aquática apresenta expressividade variável e penetrância incompleta.

RAMIAH *et alii* (1935) relataram que Kappert*, após um detalhado estudo da poliembrionia em linho, envolvendo várias gerações obtidas a partir de diferentes cruzamentos, concluiu que o caráter é recessivo, provavelmente condicionado por uma série de alelos múltiplos. WEBBER (1940) concorda com esta hipótese, afirmando que a ocorrência de linhagens altamente poliembriônicas, que surgem como segregantes a partir de híbridos, cujos parentais possuíam baixa frequência de poliembrionia, é mais um dado a favor da hipótese de Kappert*.

*KAPPERT, H. Erbliche polyembryonic bei *Linum usitatissimum*.
Biol. Zentralbl, s.l., 53:276-307, 1933.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da execução dos experimentos

O presente trabalho foi conduzido nos seguintes locais:

- a nível de campo e sob condições de casa de vegetação, no Campo Experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP;
- a nível de laboratório, nas instalações dos setores de Genética Fisiológica e de Citologia do Departamento de Genética e no Laboratório de Sementes do Departamento de Agricultura e Horticultura, ambos da ESALQ/USP.

A ESALQ está localizada em Piracicaba, SP., latitude $22^{\circ}42'$ sul, longitude $47^{\circ}38'$ oeste e altitude de 576 metros.

3.2. Material utilizado nos cruzamentos

- *ESALQ-POLI-VD2*

Esta população é derivada da variedade ESALQ-VD2 através de seleção para alta incidência de poliembrionia, realizada no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS).

- *Linhagens com gene marcador*

- braquítico (br_2br_2).
- liguleless (Lg_3Lg_3).
- japonico (jj).

As linhagens foram fornecidas pelo Instituto de Genética da ESALQ/USP.

3.3. Estudo da herança do caráter poliembrionia

A metodologia empregada teve por objetivo o estudo do número de genes que controlam o caráter poliembrionia em milho. Sendo assim, foram realizados cruzamentos recíprocos controlados entre as linhagens e a população ESALQ-POLI-VD2, afim de obter-se o híbrido F_1 e as gerações segregantes. Posteriormente todas as progênies obtidas foram avaliadas quanto à porcentagem de aparecimento de plantas poliembriônicas e de seu fenótipo através de testes de germinação e avaliação visual destas, em casa de vegetação e no

campo.

3.3.1. Obtenção da geração F_1

A fim de se obter maior coincidência no florescimento, o experimento foi instalado no campo, no ano agrícola de 83/84, em três épocas, com intervalo de uma semana entre cada uma delas. Em cada época efetuou-se o plantio de quatro blocos com dez linhas, sendo um bloco para cada um dos materiais utilizados (três linhagens e população poliembriônica). Adotou-se linhas de 5,0 m e espaçamento de 1,0 X 0,2 m.

No florescimento foram realizados cruzamentos recíprocos controlados entre as linhagens e a população poliembriônica, obtendo-se assim a geração F_1 .

A colheita foi efetuada conservando-se a individualidade de cada progênie. Todas as progênies obtidas foram identificadas, acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em câmara seca.

3.3.2. Obtenção da geração F_2

A geração F_2 foi obtida em duas épocas de plantio: em maio e novembro/84. Em ambas adotou-se o mesmo procedimento. Efetuou-se a semeadura em vasos de 400 ml (uma semen-

te por vaso) empregando-se 20 sementes de cada progênie F_1 obtida. Os vasos permaneceram em casa de vegetação até aproximadamente uma semana após a germinação. Durante este período foram observados a porcentagem de poliembriõnia e fenôtipo das plântulas em cada progênie.

O transplante para o campo foi realizado aproximadamente 12 dias após a semeadura e cada progênie foi plantada em uma linha de 8 m, no espaçamento de 1,0 m X 0,4 m.

Durante o florescimento foram autofecundadas 6 a 10 plantas de cada progênie. Procedeu-se a colheita, identificação e armazenamento das sementes da mesma forma que na geração F_1 .

3.3.3. Obtenção da geração de retrocruzamentos

Em outubro/86 efetuou-se a semeadura em vasos de 3.500 sementes da população ESALQ-POLI-VD2. Considerando-se as baixas porcentagens de germinação e de sementes poliembriônicas, foi necessária a semeadura deste grande número de sementes. As sementes foram previamente tratadas com o fungicida Arasam para prevenir doenças de sementeira, semeando-se uma semente por vaso.

Aproximadamente uma semana após a germinação, promoveu-se uma seleção no material, sendo transplantadas para

o campo apenas as plântulas múltiplas. Adotou-se o espaçamento de 1,0 X 0,4 m. Efetuou-se o plantio da geração F_1 diretamente no campo, empregando-se 15 sementes por progênie, no espaçamento de 1,0 X 0,2 m. Para a realização dos retrocruzamentos foram tomadas 10 progênies F_1 com o gene marcador braquítico. Este grupo era composto de cinco progênies onde a linhagem br_2br_2 participou como polinizadora e cinco onde ela participou como parental feminino. Dentro de cada um destes subgrupos havia duas progênies F_1 que apresentaram poliembriônia na geração F_2 (a análise da porcentagem de poliembriônia nas progênies F_2 foi efetuada antes da realização dos retrocruzamentos).

As progênies F_1 com o gene marcador braquítico comportaram-se geneticamente de maneira muito semelhante às progênies F_1 , com o gene marcador *liguleless*. Porém, as primeiras apresentavam maior facilidade de trabalho no campo, principalmente devido à coincidência do seu florescimento, com a população poliembriônica, por este motivo optou-se por elas.

Nesta fase da pesquisa decidiu-se eliminar todas as progênies com o gene marcador japonico. Tanto a linhagem *jj* como os seus híbridos eram de baixo vigor, sendo de difícil manutenção no campo. A elevada taxa de acamamento e a baixa produção de sementes levaram à obtenção de um número muito reduzido de progênies. Este fato inviabilizou a sua

utilização nos estudos genéticos.

Com o material escolhido foram realizados retrocruzamentos recíprocos controlados. Todas as plantas das progênes F_1 empregados foram identificadas. Assim foi possível observar-se, nos cruzamentos, o comportamento de cada planta F_1 quando ela foi utilizada como polinizadora e como fêmea.

As espigas foram colhidas individualmente nos dois blocos. As plantas poliembriônicas foram bastante prolíficas, devido ao maior número de colmos, produzindo em média de duas a quatro espigas. Sendo assim realizou-se a colheita no bloco com plantas poliembriônicas, de maneira que fosse possível a identificação das espigas de uma mesma planta. Todas as progênes colhidas foram armazenadas em câmara seca.

3.3.4. Obtenção da geração F_3

Nas progênes da geração F_2 foram identificadas as plantas poliembriônicas, em testes de germinação, conforme descrição no item 3.3.6. As plântulas múltiplas que surgiram foram transplantadas individualmente para vasos de 400 ml, e mantidas em casa de vegetação por sete dias. Posteriormente fez-se o transplante para o campo, em espaçamento de 1,0 X 0,4 m. Efetuou-se a autofecundação, colheita e ar

mazenamento da mesma forma que na geração F_2 .

3.3.5. Obtenção das gerações S_1 e de híbridos na população ESALQ-POLI-VD2

Em dezembro de 1985 procedeu-se a semeadura da população ESALQ-POLI-VD2 em 2.000 vasos, usando-se uma semente por vaso, os quais permaneceram na casa de vegetação por dez dias. Após este período promoveu-se uma seleção, sendo transplantadas para o campo, em blocos separados, aproximadamente 300 plântulas poliembriônicas e 200 monoembriônicas. Adotou-se o espaçamento de 1,0 X 0,4 m.

No florescimento foram efetuadas autofecundações e cruzamentos entre as plantas poli e monoembriônicas. Foram então obtidas progênies S_1 e de irmãos germanos dentro e entre os dois blocos.

3.3.6. Avaliação das progênies obtidas e dos parentais

Todo o material utilizado e obtido durante a pesquisa foi avaliado quanto a ocorrência de poliembriõnia e variação dos tipos fenotípicos. Estas análises constituíram-se basicamente de testes de germinação e avaliação visual durante todos os estágios de desenvolvimento das plantas.

.48.

Os testes de germinação foram realizados em germinador, utilizando-se toalhas de papel para germinação, do tipo Germitest Cel-065, como substrato.

Padronizou-se a utilização de 50 sementes por progênie, mantidas no germinador durante sete dias, a 30°C. Após este período efetuou-se a contagem do número de sementes mortas e de sementes com plântulas múltiplas.

Os resultados da porcentagem de poliembrionia nas progênies são apresentados considerando-se apenas as sementes que germinaram.

3.3.6.1. Avaliação dos parentais

Foram avaliadas em germinador 750 sementes de cada um dos materiais empregados como parentais.

3.3.6.2. Avaliação da geração F₁

Devido à pequena quantidade de sementes disponíveis das progênies F₁, efetuou-se a avaliação da porcentagem de poliembrionia através da semeadura em vasos, de 20 sementes de cada progênie. As contagens foram feitas uma semana após a germinação.

3.3.6.3. Avaliação da geração F_2

De cada progênie parental F_1 analisaram-se três progênies da geração F_2 , totalizando 150 sementes avaliadas em germinador.

3.3.6.4. Avaliação da geração F_3 , retrocruzamentos e gerações S_1 e de híbridos da população ESALQ-POLI-VD2

Foram analisadas 50 sementes de cada uma destas progênies, conforme item 3.3.6.

Em 67 progênies S_1 e 30 progênies de irmãos germanos também foram efetuadas contagens do número de plântulas por semente.

3.4. Comparação da eficiência da metodologia empregada para avaliação da porcentagem de poliembrionia

Analisou-se o número de plântulas múltiplas, em 10 progênies de plantas poliembriônicas, sob dois tratamentos:

- 1) Teste de germinação em germinador.
- 2) Dissecção, sob lupa, das sementes embebidas em álcool a 30%, por 20 dias.

Em ambos os tratamentos foram utilizadas 50 sementes por progênie.

3.5. Avaliação do teor de óleo das sementes monoembriônicas e poliembriônicas

Foram analisadas 300 sementes obtidas de 30 progênies que apresentavam poliembrionia. De cada progênie foram selecionadas visualmente 10 sementes, sendo 5 monoembriônicas e 5 poliembriônicas.

As 10 sementes de cada uma das 30 progênies foram numeradas e colocadas em dessecador por 7 dias. Após este período elas foram pesadas individualmente em balança analítica.

A análise do teor de óleo foi realizada também individualmente, empregando-se o método não destrutivo, denominado Ressonância Magnética Nuclear (RMN) proposto por CONWAY & EARLE (1963). Posteriormente fez-se testes de germinação, conforme descrito no item 3.3.6., para assegurar-se de que a comparação foi realmente feita entre sementes poli e monoembriônicas. Nestes testes cada progênie foi colocada sobre o papel de germinação, de modo que as 5 sementes poliembriônicas ficassem separadas das 5 sementes monoembriônicas.

3.6. Análise citológica da embriogênese nas progênes poliembriônicas

Realizou-se a análise da embriogênese das sementes mono e poliembriônicas, com a finalidade de identificar-se a origem dos embriões múltiplos nas sementes. Para esta análise, adotou-se a Técnica de Clareamento, proposta por HERR (1971).

3.6.1. Preparo do material para análise da embriogênese

Em dezembro de 1986 efetuou-se a semeadura em 1000 vasos, com sementes de 10 progênes de irmãos germanos, selecionados para alta porcentagem de poliembrionia. Após a germinação, selecionou-se 200 plântulas múltiplas, as quais foram transplantadas para o campo, em espaçamento de 1,0 X 0,4 m.

No florescimento realizaram-se autofecundações e cruzamentos entre as plantas, sendo anotado, na planta polinizada, o tipo e a data da polinização.

Para a análise da embriogênese, coletou-se 21 espigas não polinizadas, desde os estágios iniciais do desenvolvimento (primórdios de espigas com 2,0 a 3,0 cm), até sua completa formação. Coletaram-se também, espigas com sementes imaturas, desde 1 dia até 25 dias após a polinização, sendo

sempre colhidas duas espigas em cada estágio.

Desta forma foi colhido um total de 50 espigas com sementes imaturas e 21 espigas não polinizadas.

As sementes imaturas foram retiradas das espigas e colocadas em frascos com fixador Carnoy, onde permaneceram por 24 hs. Após este período o material foi lavado em água corrente, colocado em álcool a 70% e conservado em geladeira.

O material estudado foi dissecado sob lupa, sendo posteriormente colocado na solução clareadora. As dissecções foram realizadas, considerando-se o estágio de desenvolvimento das sementes imaturas e as possibilidades de passagem da luz, através delas, no microscópio onde foram feitas as observações, conforme item 3.6.1.1.

Utilizou-se a "Técnica de Clareamento", proposta por HERR (1971), que consiste na imersão do material fixado, em uma solução clareadora composta de ácido lático a 85%, fenol, eugenol, cloral hidratado e xileno, na proporção 2:2:2:2:1, em peso. As estruturas a serem observadas permanecem nesta solução por, pelo menos, 24 hs.

Após o clareamento efetuou-se a montagem das lâminas e observação em microscópio de contraste de fase.

3.6.1.1. Adaptação da "Técnica de Clareamento" para o estudo da embriogênese em mi- lho

Esta técnica tem sido normalmente utilizada pa-
ra o estudo de sacos embrionários de gramíneas forrageiras, os
quais são estruturas pequenas e que permitem a passagem da
luz, em microscópio de contraste de fase, sem a necessida-
de de retirar-se a parede do ovário.

O milho apresenta o óvulo, aproximadamente,
duas vezes maior que aquele de gramíneas forrageiras. Além
disso, o desenvolvimento dos tecidos nas sementes imaturas é
muito rápido, tornando impossível a observação das estruturas
desejadas em microscópio de contraste de fase.

Foram então realizadas dissecações, eliminan-
do-se diferentes tecidos em cada estágio do desenvolvimento
da semente, de modo que fosse possível visualizar-se o cres-
cimento e diferenciação do embrião.

3.6.2. Estudo da embriogênese

As lâminas preparadas foram observadas em mi-
croscópio de contraste de fase. Foram analisadas aproximada
mente 40 estruturas em cada estágio de desenvolvimento da se-

mente, desde zero a 20 dias após a polinização.

Nestas observações procurou-se determinar a origem e o momento em que o caráter poliembrionia se expressa. Nas fases onde foi possível identificar-se a poliembri^onia, efetuou-se contagens da porcentagem de embriões múltiplos nas progênies.

Determinou-se também o melhor estágio para estudos da porcentagem de poliembrionia utilizando-se esta técnica.

O material foi fotografado em fotomicroscópio Zeiss 3, com objetiva 10x, empregando-se filtro verde escuro e Filme Panatomic X, asa 32 (Kodak). Para as cópias empregou-se papel Kodabromide F3. Também foram feitos desenhos em câmara clara, utilizando-se um aumento de 37x em todos os esquemas.

3.7. Identificação dos cruzamentos realizados para o estudo da herança do caráter poliembrionia

Os cruzamentos realizados para obtenção das gerações estudadas foram divididos em tratamentos e identificados por um algarismo romano. Cada tratamento seguido de um algarismo romano representa um grupo de cruzamentos, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - identificação dos cruzamentos realizados.

Tratamento	Cruzamento realizado	
	♀	♂
I	ESALQ-POLI-VD2 ^a X br ₂ br ₂	
II	ESALQ-POLI-VD2 X Lg ₃ Lg ₃	
III	br ₂ br ₂ X ESALQ-POLI-VD2	
IV	Lg ₃ Lg ₃ X ESALQ-POLI-VD2	
V	ESALQ-POLI-VD2 (poli) ^b X F ₁ (tratamento I)	
VI	ESALQ-POLI-VD2 (poli) X F ₁ (tratamento III)	
VII	F ₁ (Tratamento I) X ESALQ-POLI-VD2 (poli)	
VIII	F ₁ (tratamento III) X ESALQ-POLI-VD2 (poli)	
IX	ESALQ-POLI-VD2 (poli) X ESALQ-POLI-VD2 (poli)	
X	ESALQ-POLI-VD2 (poli) - polinização livre	
XI	ESALQ-POLI-VD2 (poli) - autofecundação	
XII	ESALQ-POLI-VD2 (mono) ^c - autofecundação	
XIII	ESALQ-POLI-VD2 (poli) X ESALQ-POLI-VD2 (mono) e o recíproco	

^aNos cruzamentos foi utilizada uma amostra de sementes da população.

^bEmpregaram-se plantas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2 selecionadas em casa de vegetação.

^cPlantas únicas, selecionadas da população ESALQ-POLI-VD2 em casa de vegetação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da Embriogênese em Progenies Poliemбриônicas

4.1.1. Adaptação da Técnica de Clareamento para o Estudo da Embriogênese em Milho

A técnica de clareamento proposta por HERR (1971), foi indicada para o estudo do desenvolvimento de óvulos em angiospermas. Esta técnica tem sido empregada especialmente para o estudo da megasporogênese em gramíneas utilizadas em pastagens, sendo considerada por SAVIDAN (1981 e 1982), uma metodologia eficiente na identificação de sacos embrionários apospóricos e meióticos em *P. maximum*.

Estas gramíneas apresentam óvulos de tamanho reduzido, o que facilita a passagem da luz através deles no microscópio de contraste de fase. O óvulo de milho, é uma estrutura bem maior e, após a fertilização, tem um desenvolvimento muito rápido, o que dificulta sua visualização em con

traste de fase.

Desta forma, efetuou-se dissecação, sob lupa, eliminando-se, em cada estágio, os tecidos que não interessavam ao estudo da embriogênese.

As dissecações que ofereceram melhores resultados são apresentadas na Tabela 3.

O material com mais de 20 dias apresenta o escutelo bastante denso. Sendo assim, a observação do eixo embrionário diferenciado em plúmula e radícula somente é possível eliminando-se o escutelo. Próximo à região radicular são formados feixes vasculares por onde o embrião é nutrido durante seu desenvolvimento. Portanto esta área é constituída por tecidos densos, difíceis de serem retirados na dissecação. Esta característica inviabilizou a observação do desenvolvimento da zona radicular durante a ontogênese do embrião.

Ao contrário do estabelecido por HERR (1971), as dissecações sob lupa foram realizadas antes do material ser clarificado. Este procedimento permitiu maior rapidez nas dissecações e redução na quantidade de solução clareadora necessária.

Tabela 3 - Dissecações de óvulos e sementes imaturas, realizada das sob lupa, para estudo da embriogênese em milho empregando-se a técnica de clareamento.

Idade do material (dias após poli- nização)	Estruturas consideradas
1 a 3	Óvulo.
4	Saco embrionário e parte do nucelo.
5 e 6	Saco embrionário.
7	Aproximadamente metade do endosperma desenvol- vido, e prô-embrião.
8 a 11	Pequena parte do endosperma (localizado ao re- dor do embrião) e embrião.
12 a 20	Embrião (escutelo e eixo embrionário).
17 a 22	Eixo embrionário.

4.1.2. Estudo da Embriogênese

Neste estudo foram observados óvulos e sementes imaturas nos estágios de desenvolvimento de 0 (zero) a 20 dias após a polinização.

Em óvulos não fertilizados não foi possível observar-se o saco embrionário, embora a micrópila tenha sido facilmente localizada. Em alguns dos óvulos com um dia após a polinização, visualizou-se o saco embrionário ligado a micrópila. Entretanto o contraste desta estrutura não foi bom, impossibilitando a obtenção de fotomicrografias nítidas (Figura 4).

Nos óvulos com 3 dias observou-se perfeitamente o saco embrionário apresentando a parte basal preenchida pelas células do endosperma e a parte apical contendo ainda vários núcleos livres e o grupo de células antipodais. O aumento utilizado nas observações não permitiu visualização do pequeno pró-embrião, que neste estágio, segundo RANDOLPH (1936) apresenta de 6 a 8 células (Figura 5).

A multiplicação das células do endosperma é muito rápida neste período inicial. Esta característica pode ser observada comparando-se o tamanho do saco embrionário da Figura 4 com aquele da Figura 5.

Com 4 dias após a polinização o saco embrionário

1 mm

Figuras 4 e 5 - Saco embrionário em desenvolvimento. 4- um dia após a polinização, a seta indica a região micropilar. 5- três dias após a polinização, apresentando as antípodas (seta). 4 e 5 - 80x.

rio está praticamente preenchido por células do endosperma, apresentando núcleos livres na região das células antipodais. Embora o pró-embrião não seja visível na fotomicrografia apresentada (Figura 6), a região onde ele está localizado pode ser identificada. Em algumas das estruturas analisadas, observou-se o pró-embrião devido a posição em que o saco embrionário estava situado.

As observações feitas concordam com as de RANDOLPH (1936), que diz: "três dias após a polinização estão presentes aproximadamente 128 núcleos livres do endosperma... Com a multiplicação dos núcleos, há uma contínua migração destes para a região antipodal, preenchendo assim, a cavidade do saco embrionário. A rapidez com que o endosperma é formado contrasta com o pequeno progresso da embriogênese nas fases iniciais. O desenvolvimento do endosperma passa gradualmente da fase de núcleos para a fase celular, iniciando-se aproximadamente três dias e meio após a polinização. A formação da parede celular inicia-se na região do endosperma que circunda o embrião, e progride em direção às células antipodais. Em geral, com 4 dias o endosperma tornou-se completamente celular, exceto na região antipodal..."

Entre 5 e 8 dias observou-se o crescimento do pró-embrião (Figuras 7, 8, 9 e 10). O padrão de crescimento observado é muito semelhante àquele apresentado por RANDOLPH

1 mm

Figura 6 - Aspecto do saco embrionário quatro dias após a polinização. A região onde o pró-embrião se desenvolve (seta) situa-se acima da micrópila (80x).

1 mm

Figuras 7, 8 e 9 - Prô-embriões de milho. 7- cinco dias;
8-seis dias e 9- sete dias após a poli-
nização. 7, 8 e 9 - 80x.

(1936), na Figura 2, e KIESSELBACH (1949).

Com 8 dias (Figura 10) o prô-embrião apresenta um aspecto claviforme, devido ao intenso crescimento na região apical. Nesta fase, quando os primeiros sinais da diferenciação começam a aparecer, observou-se que alguns prô-embriões das progênes poliembrionicas apresentavam uma divisão nas últimas camadas celulares da região apical (Figura 11).

Estas divisões prosseguiram nos embriões com 9 e 10 dias (Figura 14), aumentando em número e assumindo um aspecto de brotamentos nos embriões com 10 a 12 dias. Este fenômeno foi acompanhado de um menor desenvolvimento destes embriões, em relação aos embriões normais (Figura 12 e 13) da mesma progênie.

Os embriões normais, seguem o processo normal de diferenciação, apresentando aos 12 dias o coleoptile e posteriormente os primórdios foliares. A partir de 10 dias, com o prosseguimento da diferenciação, os embriões anormais, tornam-se cada vez mais tardios, sendo facilmente identificados. Por este motivo, a contagem da frequência de poliembrionia nas progênes foi iniciada aos 10 dias.

O crescimento e a diferenciação dos poliembríões são muito lentos, sendo que em progênes com 15 dias ainda observam-se poliembríões sem diferenciação do eixo embrionário. Este desenvolvimento varia entre progênes e den-

.65.

1 mm

Figuras 10, 11 e 12 - Prô-embriões em início de diferenciação. 10- oito dias, apresenta aspecto claviforme. 11- oito dias, início de divisão na região apical (seta). 12- no ve dias. 10, 11 e 12 - 80x.

1 mm

Figuras 13 e 14 - Embriões com dez dias. 13- Detalhe da região apical de um monoembrião seguindo a diferenciação normal. 14- Embrião apresentando divisões e brotações na região apical. 13 e 14 - 80x.

.67.

tro da progênie, tendo sido encontrados poliembriões com os primórdios foliares aos 13 dias juntamente com poliembriões sem diferenciação do eixo embrionário.

O número de brotamentos observado nos estágios de 10 e 11 dias diminui acentuadamente à medida que a diferen
ciação prossegue. Provavelmente já nesta fase inicia-se a competição entre os embriões, sendo eliminados os menores. En
tre 15 e 16 dias observa-se normalmente 2 a 3 plúmulas em for
mação nos poliembriões, embora tenha ocorrido uma pequena porcentagem de poliembriões com 4 a 6 plúmulas.

A variação entre os tipos de poliembriões formados é muito grande, podendo ocorrer duas ou mais plúmulas sob um mesmo coleoptile, plúmulas em coleoptiles separados e quatro a seis plúmulas organizadas em grupos de 2 ou 3 sob um mes
mo coleoptile. Estes coleoptiles podem estar em escutelos separados ou não.

As variações observadas no desenvolvimento dos monoembriões e poliembriões são apresentadas nas Figuras 15 a 31.

A Tabela 4 apresenta resumidamente as estruturas observadas durante o estudo da embriogênese em progênies poliembriônicas.

As observações realizadas até o estágio de 20

Tabela 4 - Estruturas observadas em diferentes estágios da embriogênese em progênies poliembrionicas de milho, da população ESALQ-POLI-VD2, empregando-se a técnica de clareamento.

Idade do material (dias) ¹	Estrutura observada ²
1	Óvulo completo, observa-se claramente a micrópila, o saco embrionário (SE) dificilmente é observado.
3	Óvulo completo, saco embrionário e células antipodais.
4	Parte do nucelo, saco embrionário, endosperma e pequeno pró-embrião.
5 e 6	Saco embrionário bastante desenvolvido, endosperma e pró-embrião.
7 e 8	Parte do endosperma e pró-embrião, alguns dos pró-embriões com 8 dias estavam iniciando a diferenciação.
9 e 10	Pequena parte do endosperma (que localiza-se na região onde o embrião está situado) e embrião no início do processo de diferenciação.
11	Pequena parte do endosperma e embrião em diferenciação.
12 a 20	Embrião diferenciado em eixo embrionário e escutelo. No eixo embrionário, observa-se a região apical composta pelo coleoptile, primórdios foliares e botão vegetativo. A região basal diferenciada em coleorriza e primórdio radicular não é visível.
17 a 22	Eixo embrionário onde observa-se apenas a região apical diferenciada em coleoptile, primórdios foliares e botão vegetativo.

¹A idade do material é considerada em termos de dias após a polinização.

²Todas as observações foram realizadas em microscópio de contraste de fase, utilizando-se objetiva de 10x e ocular de 8x.

A

B

1 mm

Figura 15 - Detalhe do ápice do eixo embrionário de monoem
briões em diferenciação. A- onze dias, coleopti-
le já formado (seta). B- treze dias, coleopti-
le, primórdios foliares e botão vegetativo (se-
ta) visíveis. A e B - 80x.

A

B

1 mm

Figura 16 - Embriões anormais em desenvolvimento. **A**- Embrião com onze dias apresentando divisões e brotações. **B**- Detalhe do ápice do eixo embrionário de um embrião com treze dias onde são visíveis três botões vegetativos sob um mesmo coleoptile (seta).

dias demonstraram que os poliembriões geralmente apresentam um tamanho menor que os monoembriões, principalmente devido ao seu desenvolvimento tardio.

As contagens realizadas a partir do décimo dia (Tabela 5) indicaram que a porcentagem de poliembrionia varia entre as progênies poliembriônicas. No material avaliado observou-se uma variação de 12 a 86%.

O melhor estágio para efetuarem-se as contagens ficou estabelecido entre 12 e 13 dias, não apenas pela facilidade de distinção entre mono e poliembriões, mas também pela facilidade de dissecação do material.

Embora não tenha sido possível visualizar-se a diferenciação da radícula empregando-se a técnica de clareamento, ela foi eficiente no estudo da embriogênese, sendo uma boa metodologia para se estudar a frequência e origem da poliembrionia em milho.

Até o estágio de 4 dias foi observado um único saco embrionário em desenvolvimento. Entre 5 e 8 dias visualizou-se apenas um embrião em cada semente imatura não sendo possível distinguir entre mono e poliembrião. Nos estágios de 8 e 9 dias, quando inicia-se a diferenciação, observou-se alterações em alguns dos embriões. A partir do décimo dia, os poliembriões tornaram-se evidentes devido ao aparecimento de estruturas semelhantes a brotações, na região apical. Estas

Tabela 5 - Resultados da análise de embriogênese. Idade do material, número de observações e porcentagem de poliembriõnia observada em plantas múltiplas selecionadas da população ESALQ-POLI-VD2.

Idade do material (dias após polinização)	Nº de observações	Monoembriões	Poliembriões	% Poliembriõnia
1	32	Não diferenciados		
3	27	Não diferenciados		
4	24	Não diferenciados		
5	36	Não diferenciados		
6	27	Não diferenciados		
7	29	Não diferenciados		
8	34	Início da diferenciação		
9	62	Início da diferenciação		
Total	271			
10	60	16	44	73,33
11	32	11	21	65,66
12	31	6	25	80,65
13	41	32	9	21,95
14	56	47	9	16,07
15	57	44	13	22,81
* 15	47	25	22	46,81
16	52	26	26	50,00
17	57	8	49	85,97
18	51	45	6	11,77
19	50	8	42	84,00
20	57	21	36	63,16
Total	591	289	302	51,10

*Análise de duas progênes no estágio de 15 dias.

estruturas, com o prosseguimento da diferenciação, deram origem a 2 ou mais botões vegetativos, que caracterizam as sementes poliembriônicas.

Desta forma conclui-se que a poliembriônia observada na população ESALQ-POLI-VD2 origina-se a partir de brotações e/ou divisões em um único pró-embrião inicial, resultante de fertilização normal da oosfera. A expressão do caráter poliembriônia dá-se no momento da diferenciação, ou seja, 8 a 9 dias após a polinização. WEBBER (1940) classificou este tipo de poliembriônia como poliembriônia por clivagem do zigoto, embora o próprio autor tenha enfatizado que, no caso de angiospermas, os vários embriões seriam resultantes em maior frequência, de proliferações de células do embrião do que de divisões do zigoto.

Portanto os embriões adicionais de uma semente originam-se a partir de um único pró-embrião resultante de anfigimixia, não estando envolvida a apomixia na poliembriônia observada. Consequentemente os embriões de uma mesma semente apresentam a mesma constituição genética.

Na literatura existem exemplos de poliembriônia em monocotiledôneas onde os autores sugerem que sua origem seja devido a clivagem do zigoto, pró-embrião ou embrião, como aspargo (RANDALL & RICK, 1945 e THÉVENIN, 1968), *Agropyron* spp. (DEWEY, 1964), cevada (POPE, 1943), *L. regale* (MOR-

GAN JÚNIOR & RAPPLEYE, 1951), *A. nuda* (NISHIYAMA *et alii*, 1968) e milho (RANDOLPH, 1936; MORGAN JÚNIOR & RAPPLEYE, 1951 e SILVA *et alii*, 1971). Entretanto esta conclusão, sempre apresentada como uma hipótese, geralmente foi baseada apenas no fenótipo e contagem do número de cromossomos das plântulas múltiplas.

Apenas em dois casos foram efetuados estudos da embriogênese: em cevada (POPE, 1943) e milho (KIESSELBACH, 1926). Em cevada o autor concluiu que seria clivagem do zigoto e em milho, KIESSELBACH (1926) classificou o fenômeno como falsa poliembrionia.

Os resultados obtidos no presente trabalho, concordam com as hipóteses sugeridas por RANDOLPH (1936), MORGAN JÚNIOR & RAPPLEYE (1951) e SILVA *et alii* (1971), quanto a origem do caráter em milho. A variação fenotípica observada nas plântulas múltiplas também foi muito semelhante àquela encontrada por todos os autores, em diferentes espécies, que sugeriram ser a poliembrionia resultante de clivagem do zigoto, pró-embrião ou embrião.

Estes autores usaram a classificação sugerida por WEBBER (1940), e como não realizaram estudos embriológicos, não puderam definir quando ocorreria a clivagem e também se realmente a clivagem era o processo que melhor definia a origem da poliembrionia nas espécies estudadas.

Neste trabalho utilizou-se a mesma classificação. No entanto observou-se que a clivagem pode ocorrer, mas a maioria dos embriões múltiplos observados resultou de proliferações ou brotamentos a partir do pró-embrião, no momento de sua diferenciação.

As contagens de cromossomos foram realizadas apenas com a finalidade exploratória, sendo observado que a maioria das metáfases de mitoses das plântulas múltiplas estudadas apresentaram $2n = 20$, contudo este resultado não pode ser considerado como definitivo. Os estudos de embriogênese efetuados e os resultados obtidos nas contagens realizadas por MORGAN e RAPPLEYE (1951) indicam que a maior parte das plântulas múltiplas são diplóide-diplóide, exceto em casos onde tivesse ocorrido algum acidente mitótico durante a formação das brotações. Neste caso poderiam aparecer plântulas aneuplóides, em baixa frequência.

Os resultados de SARKAR & COE (1966), JUDIN & HVATOVA (1966 e 1970), KERMICLE (1971), ZVERZHANSKAYA *et alii* (1977), TYRNOV & ENALEENA (1984) entre outros, que observaram o aparecimento de uma alta frequência de haplóides em sementes poliembriônicas de milho, indicam que a poliembrionia presente no material estudado por eles tem origem diferente daquela presente na população ESALQ-POLI-VD2.

Embora estes autores não indiquem qual a genea

logia das populações de milho estudadas, é interessante notar que em geral, os autores que trabalharam com populações de origem americana, não encontraram haplóides e os autores que trabalharam com populações de origem européia, especialmente as russas, encontraram haplóides em alta frequência.

Este fato parece indicar que a poliembrionia em milho, da mesma forma que em outras espécies, pode ter mais de uma origem, sendo dependente do "background" da população estudada.

RANDOLPH (1936) refere-se a um tipo de semente como sendo grãos duplos, formados por duas flores intimamente unidas. Portanto as duas plantas originadas destas sementes são diplóides, apresentando fenótipos diferentes, uma vez que são resultantes de zigotos independentes.

Um outro exemplo semelhante foi a poliembrião observada em uma população de milho estudada por PESEV e PETROVIC (1976). As sementes poliembriônicas observadas por eles apresentavam 2 embriões localizados em lados opostos. Os autores não apresentaram dados sobre o fenótipo das plantas múltiplas, as contagens de cromossomos indicaram que os pares eram sempre diplóide-diplóide.

O tipo de poliembrionia observada na população ESALQ-POLI-VD2 não favorece o aparecimento de plantas múltiplas com variações na ploidia. Entretanto, a grande variação fenotípica observada entre os membros de uma semente, poderia ser resultante não apenas da competição entre eles, mas também através de falhas no processo mitótico, durante a diferenciação e crescimento dos embriões. Estas falhas poderiam resultar em plantas haplóides, aneuplóides ou poliplóides. Portanto este aspecto necessita ser melhor estudado.

Para tanto, sugere-se que além dos estudos de mitose e meiose, sejam realizados também contagens do número de estômatos das plantas múltiplas. Esta última análise talvez seja a que melhor indicará a ploidia das plantas múltiplas, pois no estágio de plântula, é difícil determinar-se exatamente a que plúmula corresponde cada sistema radicular. Observou-se inclusive a ocorrência de números diferentes de plúmulas e sistemas radiculares em uma mesma semente.

Figura 17 - Embriões com 9 (A, B) e 10 (C, D) dias. A e C - monoembriões em início de diferenciação. B e D, embriões apresentando divisões na região apical. (m - grupo de células meristemática, Δ - suspen-sor). 37x.

Figura 18 - Embriões com 14 dias. A- ápice do eixo embri-
nário diferenciado em coleoptile (c), primórdios
foliares (l) e botão vegetativo (b). B- embrião
apresentando várias brotações na parte apical,
em início de diferenciação (m - grupo de cêlu-
las meristemáticas, s - suspensor). 37x.

Figura 19 - Embriões com 14 dias. A- embrião com várias brotações na parte apical, em estágio precoce do desenvolvimento (s - suspensor). B- embrião em início de diferenciação, apresentando 3 botões vegetativos (b), sendo 2 sob um mesmo coleoptile (c) (e - escutelo, s - suspensor). 37x.

Figura 20 - Embrião com 15 dias. Monoembrião normal, iniciando a formação do eixo embrionário (b - botão vegetativo, c- coleoptile, e- escutelo, l- primórdios foliares, s- suspensor). 37x

Figura 21 - Embriões com 15 dias. A- embrião apresentando várias brotações e divisões na região apical (s- suspensor). B- dois escutelos (e) em um ûnico suspensor (s), um deles em estágio mais adiantado de diferenciação (b- botão vegetativo, c- coleoptile, l- primórdios foliares). 37x.

Figura 22 - Embrião com 15 dias apresentando o escutelo dividido (e). Início da formação do eixo embrionário com 2 ápices foliares (b- botão vegetativo, c- coleoptile, l- primórdios foliares, s- suspensor). 37x.

Figura 23 - Embrião com 15 dias diferenciado em eixo embrio
nário e escutelo (e), apresentando dois bo-
tões vegetativos (b) sob um mesmo coleoptile (c)
(l- primórdios foliares, delta- suspensor). 37x.

Figura 24 - Monoembrião com 17 dias diferenciado em eixo embrionário e escutelo (e) (b- botão vegetativo, c- coleoptile, l- primórdios foliares, s- suspensor). 37x.

Figura 25 - Embrião com 17 dias diferenciado em 2 escute-
los (e) e 2 eixos embrionários, apresentando ca
da um, 2 botões vegetativos (b) sob um mesmo
coleoptile (c) (l- primórdios foliares, s- sus-
pensor). 37x.

Figura 26 - Embrião com 17 dias diferenciado em escutelo (e) e eixo embrionário, o qual possui 3 botões vegetativos (b) sob um mesmo coleoptile (c) em estágios diferentes de desenvolvimento (l- primórdios foliares, s- suspensor). 37x.

Figura 27 - Embrião com 17 dias apresentando 3 brotações em início de diferenciação. A mais desenvolvida possui 3 botões vegetativos (b) sob um mesmo coleoptile (c) (e- escutelo, s- suspensor). 37x.

Figura 28 - Eixos embrionários de embriões com 19 dias. A- Ápice do eixo embrionário de um monoembrião diferenciado em coleoptile (c), botão vegetativo (b) e primórdios foliares (l). B- Ápice do eixo embrionário apresentando sob um mesmo coleoptile dois conjuntos de botão vegetativo (b) e primórdios foliares (l). 37x.

Figura 29 - Eixos embrionários de embriões com 20 dias.
A- Ápice do eixo embrionário duplicado, sendo que um deles apresenta 2 botões vegetativos (b) e 2 primórdios foliares. **B-** Ápice do eixo em brionário diferenciado de um monoembrião (c- coleoptile). 37x.

Figura 30 - Ápice do eixo embrionário diferenciado em primórdios foliares (*l*), botão vegetativo (*b*) e coleoptile (*c*), de um monoembrião com 21 dias. 37x.

Figura 31 - Ápice duplicado do eixo embrionário de um embrião com 21 dias, apresentando 2 botões vegetativos (*b*) e 2 primórdios foliares (*l*) sob um mesmo coleoptile (*c*). 37x.

4.2. Estudo do Fenótipo das Plantas Múltiplas

Observou-se grande variação no fenótipo das plantas obtidas de sementes poliembriônicas. Esta variação ocorreu tanto entre sementes de uma mesma progênie como entre plantas de uma mesma semente. Além da variação fenotípica, as progênies diferiram em frequência de poliembrionia.

Em todas as gerações obtidas observou-se o mesmo padrão de variação das plantas múltiplas nos estágios de semente, plântula e planta adulta.

4.2.1. Semente

As sementes poliembriônicas apresentam tamanho e peso semelhante às monoembriônicas. Geralmente elas podem ser identificadas visualmente, devido a presença de dois ou mais embriões, localizados lado a lado, em uma mesma face da semente (Figura 32). Entretanto há sempre uma pequena porcentagem de sementes poliembriônicas que apresentam mais de uma plúmula sob um mesmo coleoptile (Figura 31), ou mais de uma radícula sob uma única coleoriza, que não podem ser identificadas visualmente.

Figura 32 - Sementes poliembriônicas e monoembriônica (seta).

Os embriões múltiplos de uma semente variam quanto ao número, tamanho e disposição. Através da análise visual foi possível identificarem-se até 5 embriões em uma semente. A medida que aumenta o número de embriões, há uma diminuição no tamanho destes, embora tenham sido encontradas sementes com apenas dois embriões, apresentando um deles com tamanho muito reduzido. A disposição dos embriões pode variar desde perfeitamente paralelos até um ângulo de aproximadamente 90° .

Foi observado que as sementes poliembriônicas geralmente apresentam o escutelo dividido e um eixo embrionário completo em cada uma destas divisões. Entretanto também ocorrem dois eixos embrionários em um único escutelo e eixos embrionários com apenas a região apical duplicada.

Todas estas variações foram também observadas nos estudos da embriogênese, portanto o fenótipo das sementes poliembriônicas reflete as alterações ocorridas durante a formação dos embriões.

A diferença de tamanho entre os embriões pode ser explicada através da competição existente entre eles, durante a embriogênese, uma vez que todos são monozigóticos.

4.2.1.1. Análise do Teor de Óleo das Sementes Monoembriônicas e Poliembriônicas

O método adotado baseia-se em medições das bandas de ressonância magnética nuclear emitidas pelo óleo presente nas sementes, quando estimulado por uma fonte externa de energia. Estas bandas são diretamente proporcionais ao conteúdo de óleo das sementes. CONWAY & EARLE (1963) observaram que as análises do teor de óleo através da ressonância magnética nuclear apresentavam uma correlação de $r = 0,993$ com os resultados obtidos através das análises tradicionais, que envolvem extrações por solvente. Este último método é também conhecido como método destrutivo, pelo fato de ser necessário triturarem as sementes para efetuarem-se as análises.

Neste trabalho, como o objetivo era comparar-se o teor de óleo das sementes monoembriônicas com aquele das poliembriônicas, o método destrutivo não poderia ser utilizado. Isto porque era necessária a germinação destas sementes para confirmar se a comparação estava sendo feita entre sementes monoembriônicas e poliembriônicas. Como já foi discutido no item 4.2.1., às vezes a semente poliembriônica pode ser classificada como monoembriônica.

A seleção visual realizada foi conferida em testes de germinação, tendo sido 100% eficiente. Os resultados da análise do teor de óleo são apresentados resumidamente na

Tabela 6 (os dados completos estão no Apêndice 1). Através dos dados de porcentagem e quantidade de óleo nas sementes, observa-se que praticamente não há variação entre sementes monoembriônicas e poliembriônicas. O peso destas sementes também foi muito semelhante, indicando que as sementes poliembriônicas não apresentam vantagens em relação às monoembriônicas, para as duas características avaliadas.

Embora visualmente tenha-se a impressão que os vários embriões das sementes poliembriônicas resultam numa relação embrião/endosperma maior, isto não ocorre. A espessura dos vários embriões é menor, de tal forma que a área ocupada por eles é aproximadamente igual àquela ocupada pelos monoembriões.

A porcentagem de proteínas e o valor biológico destas, não foi avaliada em sementes poliembriônicas. Entretanto através dos resultados obtidos pode-se supor que também não haverá alteração significativa nestes parâmetros em relação às sementes monoembriônicas.

Estes resultados discordam daqueles obtidos por PESEV & PETROVIC (1976). Considerando-se o tipo de semente poliembriônica avaliada por estes autores, e as considerações de RANDOLPH (1936), pode-se concluir que provavelmente PESEV & PETROVIC (1976) selecionaram progênies que apresentavam o caráter grãos duplos. Portanto estas sementes, sendo estruturas

Tabela 6 - Resultados da análise do teor de óleo das sementes mono e poliembrionicas, em termos de média ($\bar{M}$) de 30 progênes obtidas de plantas múltiplas selecionadas da população ESALQ-POLI-VD2.

$\bar{M}$ da % de óleo das sementes		$\bar{M}$ do peso das sementes (mg)		$\bar{M}$ da quantidade de óleo (mg) das sementes	
Mono ^a	Poli ^b	Progênie ^c	Mono	Poli	Progênie
4,80	4,61	4,71	238,99	242,98	240,99
			11,50	11,27	11,39

^a Média de 150 sementes monoembrionicas, sendo 5 sementes de cada progênie analisada.

^b Média de 150 sementes poliembrionicas, sendo 5 sementes de cada progênie analisada.

^c Média de 30 progênes analisadas.

compostas, certamente teriam peso, teor de óleo, proteínas e valor biológico superiores aos grãos únicos.

Quanto ao híbrido com elevado teor de proteínas, obtido por GOLOVIN (1982), a partir de haplóides duplicados de sementes poliembriônicas, a comparação torna-se difícil pois, como já foi discutido, o tipo de poliembrionia observada por este autor é de origem diferente daquela presente na população ESALQ-POLI-VD2.

Com base nos resultados obtidos, o caráter poliembrionia, resultante de proliferação do pró-embrião, não tem valor para o melhoramento de milho visando a elevação do teor de óleo e proteínas das populações ou híbridos.

4.2.2. Plântula

As plântulas múltiplas, em geral, desenvolveram-se mais lentamente que as plantas únicas. Houve variação no número e tipo de plântulas múltiplas obtidas. Quanto ao tipo, pode-se classificá-las em três grupos: totalmente separadas, parcialmente unidas e duas ou mais unidas ao lado de uma ou mais separadas, em uma mesma semente.

Entre as plântulas separadas houve variação no tamanho e vigor e, entre as plântulas unidas, no grau de união. Foi relativamente comum o aparecimento de mais de uma plúmu-

la a partir de um coleoptile, de pares onde uma das plântulas emitiu apenas a primeira folha, que permaneceu na forma de cartucho (Figura 33.a), morrendo nas primeiras semanas e de plântulas idênticas.

Algumas destas variações podem ser observadas na Figura 33.

Estas variações ocorreram tanto no ápice como na base do eixo embrionário.

Observou-se plântulas totalmente anormais, onde 5 ou 6 plúmulas originavam-se a partir de um mesmo mesocótilo. Estas morreram nas primeiras semanas. Algumas sementes deram origem a dois ou três sistemas radiculares e nenhuma plúmula, outras apresentavam o coleoptile vazio. Entre mais de 5.000 plântulas múltiplas avaliadas, não observou-se nenhum caso de variação na coloração das plântulas irmãs.

As variações observadas podem ser explicadas através dos resultados obtidos no estudo da embriogênese.

Plântulas anormais como aquela da Figura 33.a poderiam ser resultantes de falhas na diferenciação do embrião adicional, durante a embriogênese, tanto por diferenciação incompleta como por distúrbios no processo mitótico, originando embriões adicionais aneuplóides.

As variações observadas estão de acordo com os

Figura 33 - Variações fenotípicas das plântulas múltiplas. a- uma das plântulas é normal, enquanto que a outra emitiu apenas uma folha que permaneceu na forma de cartucho; b- duas plúmulas a partir de um único coleoptile.

resultados de MORGAN JÚNIOR & RAPPLEYE (1951) e SILVA *et alii* (1971), que sugeriram ser a clivagem do embrião, a causa da poliembrionia em milho. Outros autores (POPE, 1943; RANDALL & RICK, 1945; DEWEY, 1968; NISHIYAMA *et alii*, 1968, estudando diferentes espécies, também observaram esta mesma variação.

KIESSELBACH (1926) relatou as mesmas variações citadas neste trabalho. Entretanto o autor considerou que o fenômeno observado em milho não era herdável e denominou-o de falsa poliembrionia. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se dizer que provavelmente o caráter observado por KIESSELBACH (1926) é o mesmo presente na população ESALQ-POLI-VD2, tendo portanto ocorrido uma confusão de terminologias por parte do autor. Além disso, o aparecimento apenas de sementes monoembriônicas em progênies endogâmicas (S_1) obtidas de plântulas múltiplas, que levou KIESSELBACH (1926) a classificar o fenômeno como não herdável, também foi observado neste trabalho. Entre 73 progênies S_1 analisadas, 3 apresentaram apenas plantas únicas. Entretanto os resultados de quase 1.600 progênies avaliadas, de diferentes gerações, mostraram claramente que o caráter apresenta um controle genético.

Quanto à variação no número de plântulas por semente, observou-se que ocorriam de 2 a 7 plântulas. Em 97

progênie analisadas quanto a esta característica, sendo 67 endogâmicas e 30 de irmãos-germanos, os conjuntos de 2 e 3 plântulas em uma mesma semente representaram mais de 90% dos casos (Tabela 7). Praticamente não houve diferença na distribuição do número de plântulas por semente entre estes dois tipos de progênie (Figura 34). Entre as progênie de irmãos-germanos observou-se uma frequência levemente superior de sementes com 4 e 5 plântulas. Este fato parece ser devido ao maior vigor das plântulas em comparação com aquelas resultante de autofecundação, portanto os vários embriões formados seriam mais aptos a germinar. Nos Apêndices 2 e 3 são apresentados os resultados da variação do número de plântulas por semente em cada progênie analisada.

Os vários autores consultados relataram um máximo de 4 plântulas por semente poliembriônica, tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas, excetuando-se os casos de poliembrionia adventícea.

4.2.3. Planta Adulta

As plântulas múltiplas foram transplantadas para o campo sem haver separação dos membros de uma semente. Em dois blocos, sendo um constituído de plantas múltiplas e outro de plantas únicas de uma mesma progênie, observou-se que

Tabela 7 - Número de sementes com 2 a 7 plântulas e número total de sementes poliembrionicas em progênies endogâmicas (S_1) e de irmãos germanos (IG), obtidas a partir de plantas múltiplas selecionadas da população ESALQ-POLI-VD2.

ic	tp	nps							sp	% nps					
		2	3	4	5	6	7	2		3	4	5	6	7	
IG	30	323	107	40	6	2	0	478	67,57	22,38	8,37	1,26	0,42	0,00	
S ₁	67	455	134	28	2	1	1	621	73,27	21,58	4,51	0,32	0,16	0,16	
Total	97	778	241	68	8	3	1	1099	70,79	21,93	6,19	0,73	0,27	0,09	

ic = Identificação do cruzamento.

tp = Número total de progênies analisadas.

nps = Número de plântulas por semente.

sp = Número total de sementes poliembrionicas nas progênies analisadas.

%nps = Frequência do número de sementes com 2 a 7 plântulas.

Figura 34 - Distribuição do número de plântulas por semente poliembriônica entre progênies de irmãos-germanos (a) e endogâmicas (b) obtidas de plantas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2.

as primeiras eram mais tardias que as últimas.

Os conjuntos de plantas múltiplas apresentaram variações fenotípicas entre si e entre plantas de uma mesma semente, refletindo as diferenças observadas durante o estágio de plântula. As plantas gêmeas, que foram consideradas idênticas durante os estágios iniciais de desenvolvimento, conservaram esta característica no estágio adulto, apresentando mesmo número e orientação de folhas, altura de espiga, de planta e floresceram juntas. Na Figura 35 estão representados dois conjuntos de plantas gêmeas.

Observou-se também que muitos conjuntos apresentavam diferenças entre as plantas, principalmente com relação a altura, vigor e início do florescimento. Em alguns casos uma das plantas permaneceu pequena (30 a 40 cm) e não floresceu. Outras mostraram macho-esterilidade.

O bloco com plantas únicas floresceu 4 a 5 dias antes daquele com plantas múltiplas, refletindo o comportamento tardio dos poliembriônicos, já observado desde os estudos de embriogênese. Além disso, as plantas únicas foram mais uniformes quanto ao florescimento, sendo que em 7 dias todo o bloco floresceu, enquanto que o florescimento do bloco de plantas múltiplas estendeu-se por 20 dias.

Embora tenham sido observadas estas diferenças fenotípicas entre as plantas irmãs, as espigas produzidas por

Figura 35 - Plantas gêmeas idênticas. Em primeiro plano, um par de plantas e em segundo, 3 plantas. Notar a mesma altura de espiga, de planta e orientação das folhas (setas).

elas apresentaram mesmo formato, tamanho, tipo de endosperma e coloração de grãos, confirmando a origem monozigótica das plantas múltiplas (Figura 36).

A população estudada era muito heterozigótica, uma vez que era constituída de plantas obtidas de progênies S_1 , portanto houve grande variação entre conjuntos de plantas múltiplas, como pode ser observado na Figura 36. Entretanto entre plantas de uma mesma semente, as espigas foram idênticas. A variação fenotípica observada entre as plantas irmãs durante o estágio vegetativo, provavelmente é resultante da competição entre elas. Estes mesmos resultados foram obtidos por KIESSELBACH (1926) e RANDOLPH (1936).

Observou-se uma porcentagem de acamamento de plantas muito maior no bloco constituído por plantas múltiplas que no bloco de plantas irmãs. Este fato resultou do sistema de plantio adotado, não individualizando-se as plantas múltiplas. Desta forma, as raízes não foram suficientes para suportar o peso de 2 a 4 espigas em plantas separadas, sob um mesmo sistema radicular.

O índice espigas/semente poliembriônica observado no bloco de plantas múltiplas (Tabela 8) demonstrou a prolificidade destas. Embora este índice esteja subestimado, devido ao tombamento e às polinizações manuais, ele demonstra a superioridade das sementes poliembriônicas em relação às

Figura 36 - Espigas colhidas de 4 conjuntos de plantas múltiplas, sendo 3 deles constituídos por 2 plantas e um por quatro plantas. Observa-se grande semelhança entre espigas de um mesmo conjunto.

Tabela 8 - Número total de espigas colhidas e índice espigas/semente poliembrionica observado em um bloco constituído por plantas múltiplas selecionadas da população ESALQ-POLI-VD2.

Produção de espigas por semente poliembrionica	Casos observados	Total de espigas colhidas	Índice espigas/semente poliembrionica
1	96	96	1
2	53	106	2
3	15	45	3
4	0	0	-
5	1	5	5
Total	165	252	1,53

monoembriônicas, para prolificidade. No bloco de plantas únicas colheu-se uma espiga por semente.

O índice foi estabelecido em termos de espigas/semente porque a característica das sementes poliembriônicas é o aumento na prolificidade devido a um maior número de plantas no campo e não do maior número de espigas por planta.

4.3. Estudo da Herança do Caráter Poliembrionia em Milho

Os estudos genéticos do caráter poliembrionia foram realizados através do cruzamento de plantas da população, ESALQ-POLI-VD2 com linhagens contrastantes para o caráter, que apresentam gene marcador. Os resultados da porcentagem de poliembrionia nos parentais são apresentados na Tabela 9.

A avaliação da porcentagem de poliembrionia em todas as gerações obtidas foi realizada através de testes de germinação. Considerou-se como progênie poliembriônica, aquela que apresentou pelo menos um conjunto de plântulas múltiplas no teste de germinação.

A análise dos resultados obtidos foi efetuada de acordo com PARLEVLIET & CAMERON (1959), IWAMASA *et alii* (1967) e SAVIDAN (1981 e 1982), estudando-se inicialmente a

Tabela 9 - Resultado da análise dos parentais em teste de germinação. P1: população ESALQ-POLI-VD2, P2: linha gens com o gene marcador braquítico e P3: linha gens com o gene marcador liguleless.

Parental	Total de sementes	Plântulas observadas	$\bar{M}$ de germinação	Total de plântulas múltiplas	Frequência $\bar{M}$ de plântulas múltiplas(%)
P1	750	680	93,15	124	18,24
P2	750	730	97,33	0	0
P3	750	690	92,00	0	0
Total	2250	2100	93,33		

presença ou ausência do caráter poliembrião e posteriormente a frequência de poliembrião nas progênes.

4.3.1. Geração F_1

O número total de progênes obtidas e analisadas é apresentado nas Tabelas 10 e 11. Os resultados dos testes de germinação, número de progênes poliembriônicas e porcentagem de poliembrião, estão nas Tabelas 12 e 13. Das 218 progênes F_1 avaliadas, apenas 7 mostraram o caráter, sendo este em porcentagem muito baixa (0,29%). Estes dados parecem demonstrar que a poliembrião é recessiva em relação a monoembrião.

A porcentagem de germinação nos tratamentos I e II, onde a população ESALQ-POLI-VD2 foi o parental feminino, mostrou-se ligeiramente inferior aos tratamentos III e IV, que correspondem aos cruzamentos recíprocos (Tabela 12). Supõe-se que este resultado foi obtido em função do menor vigor de plantas observado no campo, e tamanho reduzido das sementes e plantas dessa população. Além disso, o tombamento de plantas da população ESALQ-POLI-VD2 propiciou um maior ataque de fungos nas sementes, o qual também contribuiu para a redução na taxa de germinação.

O aparecimento de poliembrião especificamen-

Tabela 10 - Número total de progênies obtidas nas gerações F_1 , F_2 e F_3 .

Tratamento	Cruzamentos		F_1	F_2	F_3
	♀	♂			
I	Poli ^a x br ₂ br ₂ ^b		41	377	35
II	Poli x Lg ₃ ____ ^c		60	424	11
III	br ₂ br ₂ x Poli		71	641	16
IV	Lg ₃ Lg ₃ x Poli		46	328	-
Total			218	1770	62

a = Plantas da população ESALQ-POLI-VD2.

b = Linhagens com o gene marcador braquítico.

c = Linhagens com o gene marcador liguleless.

Tabela 11 - Número total de progênies analisadas quanto a frequência de poliembrião, das gerações F_1 , F_2 e F_3 .

Tratamento	F_1	F_2^*	F_3
I	41	237	35
II	60	156	11
III	71	212	16
IV	46	123	-
Total	218	728	62

*De cada progênie F_1 , avaliou-se em média três progênies F_2 .

Tabela 12 - Número total de progênies F_1 e de sementes avaliadas. Número de plântulas e porcentagem média ($\bar{M}$) de germinação em cada tratamento.

Tratamento	Progênies F_1	Total de sementes	Plântulas observadas	$\bar{M}$ de germinação (%)
I	41	820	750	91,46
II	60	1200	1105	92,08
III	71	1420	1338	94,23
IV	46	920	878	95,43
Total	218	4360	4071	93,37

Tabela 13 - Resultados da análise em testes de germinação das progênes F₁ obtidas. Número total, porcentagem de progênes poliembriônicas e de plântulas múltiplas observadas em cada tratamento.

Tratamento	Progênes F ₁	Taxa* M:P	% de progênes F ₁ poliembriônicas	Total de plântulas múltiplas	Frequência $\bar{M}$ de plântulas múltiplas (%)
I	41	41:0	0	0	0
II	60	57:3	5,00	8	0,72
III	71	71:0	0	0	0
IV	46	42:4	8,70	4	0,46
Total	218	211:7	3,21	12	0,29

*Relação entre o número de progênes monoembriônicas e poliembriônicas da geração F₁.

te nos tratamentos II e IV, onde um dos parentais apresentava o gene marcador *liguleless* (Lg_3Lg_3), não tem uma explicação clara. Uma das hipóteses formuladas sugere que provavelmente houve um parental em comum, que apresentava o caráter poliembriônica, na constituição da população ESALQ-POLI-VD2 e da população de onde foram obtidas as linhagens *liguleless*. Embora esta última tenha passado por vários ciclos de recombinação e seleção para outros caracteres, o caráter poliembriônica não foi completamente eliminado. A frequência do caráter na população original das linhagens *liguleless* não foi suficiente para ser detectado. Porém em cruzamento com plantas da população ESALQ-POLI-VD2 a poliembriônica pôde expressar-se.

4.3.2. Geração F_2

As plantas múltiplas observadas na geração F_1 foram autofecundadas, exatamente como as plantas únicas F_1 , identificadas e avaliadas separadamente. Os resultados da análise destas progênes encontram-se nas Tabelas 14 e 15.

Das 10 progênes F_2 avaliadas, 8 eram poliembriônicas. A frequência de poliembriônica entre as 434 plântulas observadas foi de 9,68%, que é significativamente superior à frequência de 0,75% (Tabela 17), observada na geração F_2 , obtida através da autofecundação das plantas únicas da ge

Tabela 14 - Número total de progênies F_2 e de sementes analisadas, obtidas através da autofecundação das plântulas múltiplas que apareceram na geração F_1 . Número de plântulas e porcentagem média ($\bar{M}$) de germinação nos tratamentos II e IV.

Tratamento	Progênies F_2	Total de sementes	Plântulas observadas	$\bar{M}$ de germinação (%)
I	-	-	-	-
II	6	253	239	97,47
III	-	-	-	-
IV	4	200	195	97,50
Total	10	453	434	95,81

Tabela 15 - Resultados da análise em testes de germinação das progêneses F_2 , obtidas através da autofecundação das plantas múltiplas que apareceram na geração F_1 . Número total e porcentagem de progêneses poliembriônicas e de plântulas múltiplas observadas em cada tratamento.

Tratamento	Progêneses F_2	Taxa* M:P	% de progêneses F_2 poliembriônicas	Total de plântulas múltiplas	Frequência $\bar{M}$ de plântulas múltiplas(%)
I	-	-	-	-	-
II	6	0:6	100,00	29	12,13
III	-	-	-	-	-
IV	4	2:2	50,00	13	6,67
Total	10	2:8	80,00	42	9,68

*Relação entre o número de progêneses monoembriônicas e poliembriônicas na geração F_2 , obtida a partir da autofecundação das plântulas múltiplas que apareceram na geração F_1 .

ração F_1 , de todos os tratamentos (Tabela 17.a).

Os resultados da análise da geração F_2 , exce-
tuando-se as 10 progênies obtidas das plantas múltiplas obser-
vadas na geração F_1 , são apresentados nas Tabelas 16 e 17.a.

Das 218 progênies F_1 das quais no total foram
avaliadas 728 progênies da geração F_2 , observou-se que 46,33%
das progênies F_1 apresentaram poliembriõnia entre suas progê-
nies F_2 (Tabela 17.b). Este resultado sugere que provavelmente
na população ESALQ-POLI-VD2, as plantas múltiplas eram hetero-
zigotas para o caráter em estudo. Estas quando cruzadas com
linhagens monoembriônicas originam dois tipos de progênies F_1 ,
que sob autofecundação, podem ou não expressar o caráter.

Entre as 728 progênies F_2 analisadas, 141 eram
poliembriônicas, ou seja, 19,37%. Este resultado aproxima-se
muito do modelo genético proposto por TALIAFERRO & BASHAW
(1966) para explicar a herança da apomixia em *P. ciliare*. Neste
modelo, a apomixia seria controlada por dois genes, **A** e **B**. O
gene **A** condiciona a apomixia e sofre epistasia de **B**, que con-
diciona a sexualidade. Na geração F_2 os autores encontraram
a segregação 13 sexuais: 3 apomíticos, ou seja, 18,75% de apo-
míticos, que é a frequência fenotípica esperada, aplicando-se
este modelo. A hipótese foi confirmada quando TALIAFERRO & BASHAW
(1966) realizaram os retrocruzamentos e a segregação observa-
da não diferiu do resultado teórico esperado de 5 sexuais: 3

Tabela 16 - Número total de progênies F_2 e de sementes avaliadas. Número de plântulas e porcentagem média ($\bar{M}$) de germinação em cada tratamento.

Tratamentos	Progênies F_2	Total de sementes	Plântulas observadas	$\bar{M}$ de germinação (%)
I	237	11850	11082	93,52
II	156	7774	7217	92,84
III	212	10600	9998	94,32
IV	123	6090	5679	93,25
Total	728	36314	33976	93,56

Tabela 17.a- Resultados da análise em testes de germinação das progêneses F_2 . Número total, porcentagem de progêneses poliembriônicas e de plantas múltiplas observadas em cada tratamento.

Tratamento	Progêneses F_1	Taxa* M:P	% de progêneses F_2 poliembriônicas	Total de plântulas múltiplas	Frequência $\bar{M}$ de plântulas múltiplas(%)
I	237	198:39	16,46	53	0,48
II	156	112:44	28,21	112	1,55
III	212	175:37	17,45	57	0,57
IV	123	102:21	17,07	34	0,60
Total	728	587:141	19,37	256	0,75

*Relação entre o número de progêneses monoembriônicas e poliembriônicas na geração F_2 .

Tabela 17.b - Total de progênies da geração F_1 que apresentaram poliembrião entre suas progênies da geração F_2 .

Tratamen to	Número de progê- nias F_1 avaliadas*	Progênies F_1 que apresentaram po- liembrião na geração F_2	% de progênies F_1 que apresen- taram poliemb- rião
I	41	24	58,54
II	60	30	60,00
III	71	30	42,25
IV	46	17	36,95
	218	101	46,33

*De cada progênie F_1 foram avaliadas em média, 3 progênies F_2 .

apomíticos.

No estudo de TALIAFERRO & BASHAW (1966) a população analisada era homozigótica para o caráter avaliado. Aplicando-se este modelo para o caráter poliembrionia em milho, considerando-se entretanto que a população ESALQ-POLI-VD2 é heterozigótica para o caráter, estabeleceu-se que A condicionaria a monoembrionia e B a poliembrionia, sendo que este sofre epistasia em relação a A. Portanto o genótipo das sementes poliembriônicas seria aaB_ e, o genótipo das monoembriônicas da geração F₂, A___ ou aabb.

Considerando-se a população ESALQ-POLI-VD2 em equilíbrio, as frequências fenotípicas esperadas na geração F₂ seriam de 55/64 progênies monoembriônicas (M) e 9/64 progênies poliembriônicas (P), ou seja, 85,94% M:14,06% P.

Parental
monoembriônica (M)

AAbb

X

População ESALQ-POLI-VD2
poliembriônica (P)

aaB_

F₁: 3/4 AaBb (M).

: 1/4 Aabb (M).

F₂: frequências fenotípicas esperadas: $\frac{55}{64}$ M: $\frac{9}{64}$ P

Embora as frequências observadas (80,63%M:19,37P)

sejam significativamente diferentes daquelas previstas pelo modelo adotado, tanto elas como aquelas obtidas nas gerações F_1 e F_3 (Ítem 4.3.3.) aproximam-se dos valores teóricos esperados. Entretanto a segregação observada nos retrocruzamentos foi de 77,03% de progênies poliembriônicas (próxima de 1M:3P), que difere daquela esperada de $\frac{37}{64}$ M: $\frac{27}{64}$ P (próxima de 1M:1P).

Provavelmente os desvios observados são resultantes do método de avaliação utilizado, como será discutido no Ítem 4.3.5.

4.3.3. Geração F_3

As plântulas múltiplas que apareceram na geração F_2 foram transplantadas para o campo. Entretanto, das 256 plântulas observadas obteve-se apenas 62 progênies F_3 devido ao elevado índice de mortalidade durante este transplante. Isto ocorreu porque foram necessários dois transplantes: do papel de germinação para os vasos, em casa de vegetação, e desta para o campo.

Os resultados das análises da geração F_3 são apresentados nas Tabelas 18 e 19. Entre 62 progênies analisada

Tabela 18 - Número total de progênies F_3 e de sementes avaliadas. Número de plântulas e porcentagem média ($\bar{M}$) de germinação nos tratamentos I, II e III.

Tratamentos	Progênies F_3	Total de sementes	Plântulas observadas	$\bar{M}$ de germinação (%)
I	35	1749	1619	92,57
II	11	550	489	88,91
III	16	765	653	85,36
IV	-	-	-	-
Total	62	3064	2761	90,11

Tabela 19 - Resultados de análise em testes de germinação das progêneses F_3 . Número total, porcentagem de progêneses poliembriônicas e de plântulas múltiplas observadas em cada tratamento.

Tratamento	Progêneses F_3	Taxa* M:P	% de progêneses F_3 poliembriônicas	Total de plântulas múltiplas	Frequência $\bar{M}$ de plântulas múltiplas(%)
I	35	4:31	88,57	149	9,20
II	11	3:8	72,72	67	13,70
III	16	10:6	37,50	42	6,43
IV	-	-	-	-	-
Total	62	17:45	72,58	258	9,34

*Relação entre o número de progêneses monoembriônicas e poliembriônicas na geração F_3 .

das, 45 eram poliembriônicas. A frequência de poliembriõnia observada entre 2.761 plântulas analisadas, foi de 9,34%, muito semelhante a 9,68%, obtida pela autofecundação das plantas múltiplas da geração F_1 .

4.3.4. Geração de Retrocruzamento

Os resultados das análises das 222 progênes obtidas encontram-se nas Tabelas 20 e 21. Como já foi discutido no item 4.3.2., o número de progênes poliembriônicas encontradas não comprovou a hipótese inicialmente formulada, baseada no trabalho de TALIAFERRO & BASHAW (1966).

O controle das polinizações efetuado conforme descrição no item 3.3.3. demonstrou que a presença ou ausência do caráter não é afetado pelos parentais utilizados no cruzamento entretanto a frequência de plântulas poliembriônicas na progênie resultante varia de acordo com a planta da população ESALQ-POLI-VD2 que foi empregada no cruzamento.

As cinco progênes F_1 utilizadas nos retrocruzamentos, que não haviam apresentado poliembriõnia entre suas progênes da geração F_2 , apresentaram poliembriõnia quando empregadas como parentais (tanto masculino como feminino) nos retrocruzamentos.

Tabela 20 - Número total de retrocruzamentos e de sementes avaliados. Número de plântulas e porcentagem média ($\bar{M}$) de germinação nos tratamentos V, VI, VII e VIII.

Tratamento	Cruzamento		Retrocruzamentos	Total de sementes	Plântulas observadas	$\bar{M}$ de germinação (%)
	♀	♂				
V	Poli X F ₁ (tratamento I)		58	2885	2688	93,17
VI	Poli X F ₁ (tratamento III)		70	3500	3236	92,46
VII	F ₁ (tratamento I) X Poli		48	2400	2308	96,17
VIII	F ₁ (tratamento III) X Poli		46	2278	2152	94,47
Total			222	11063	10384	93,86

Tabela 21 - Resultados da análise em testes de germinação das progênes obtidas nos retrocruzamentos (RC). Número total, porcentagem de progênes poliembrionicas e de plântulas múltiplas observadas em cada tratamento.

Tratamento	Retrocruzamentos	Taxa* M:P	% de progênes RC poliembrionicas	Total de plântulas múltiplas	Frequência $\bar{M}$ de plântulas múltiplas(%)
V	58	17:41	70,69	172	6,40
VI	70	14:56	80,00	180	5,56
VII	48	7:41	85,42	163	7,06
VIII	46	13:33	71,74	100	4,65
Total	222	51:171	77,03	615	5,92

*Relação entre o número de progênes monoembrionicas e poliembrionicas na geração de retrocruzamentos.

4.3.5. Discussão dos Resultados Obtidos nas Gerações F_1 , F_2 , F_3 e Retrocruzamento

Analisando-se a Tabela 22, observa-se claramente que o caráter poliembriõnia é controlado geneticamente, tendo aumentado durante as gerações analisadas, tanto em porcentagem de progênies que o apresentam como em frequência de plântulas poliembriônicas por geração. O aumento no número de progênies poliembriônicas parece indicar que o caráter realmente é qualitativo e provavelmente controlado por um ou dois genes. Entretanto não foi encontrado nenhum modelo genético que explique completamente os dados obtidos.

Tendo em vista esta situação, duas indagações podem ser feitas: quanto à exatidão dos cruzamentos realizados e quanto à eficiência da metodologia de avaliação empregada.

As polinizações foram realizadas manualmente, seguindo-se a técnica normalmente empregada para efetuar-se cruzamentos controlados em milho. Protegeu-se a espiga antes que os estilo-estigmas surgissem, e o pendão sempre no dia anterior à polinização. Durante a realização dos cruzamentos foram tomados todos os cuidados necessários para evitar-se contaminações. Em todas as gerações as polinizações foram feitas pela mesma pessoa. Embora todas as precauções tenham sido tomadas, sempre poderia ocorrer uma pequena porcentagem de

Tabela 22 - Resumo dos resultados obtidos da porcentagem de poliembrionia nos parentais e gerações F₁, F₂, F₃, e retrocruzamento.

Geração	Progênes analisadas	Taxa M:P	% de progênes poliembrionicas	Plântulas observadas	Total de plântulas múltiplas	Frequência $\bar{M}$ de poliembrionia (%) na geração
P ₁ ^a				680	124	18,24
P ₂ ^b				1420	0	0
F ₁	218	211:7	3,21	4071	12	0,29
F ₂	728	587:141	19,37	33976	256	0,75
RC	222	51:171	77,03	10384	615	5,92
F ₃ ^c	62	17:45	72,58	2761	258	9,34
Total	1230			53292		

^aMistura de várias progênes da população ESALQ-POLI-VD2.

^bMistura de várias linhagens com gene marcador (braquíptico e liguleless).

^cProgênes obtidas através da autofecundação de plantas múltiplas que apareceram na geração F₂.

contaminações. Mesmo considerando-se que estas tenham ocorrido, elas não seriam em um índice capaz de alterar os resultados a ponto de não ser possível enquadrá-los em um modelo genético.

O emprego dos testes de germinação, na avaliação das progênies obtidas, foi baseado nos trabalhos desenvolvidos por diversos autores, com diferentes espécies, cujo objetivo era avaliar-se a porcentagem de poliembrionia na população estudada. Excetuando-se PARLEVLIET & CAMERON (1959), IWAMASA *et alii* (1967) e CAMERON & SOOST (1979) que estudaram as progênies poliembriônicas de *Citrus* spp através da dissecação das sementes e contagem do número de embriões, todos os outros autores consultados empregaram a avaliação em testes de germinação. Embora eles tenham observado que devido à competição entre embriões, a porcentagem de poliembrionia poderia ser subestimada, eles relataram que este desvio era pequeno.

No caso de espécies que apresentam sementes pequenas ou de difícil dissecação, o teste de germinação parecia ser o mais indicado, uma vez que a análise embriológica, empregando-se a técnica da parafina é praticamente inviável, tendo em vista a quantidade de sementes que precisam ser avaliadas durante um estudo genético.

Desta forma, decidiu-se aplicar o teste de germinação na avaliação das progênies obtidas neste trabalho.

Entretanto, devido aos desvios observados nos resultados, SAVIDAN* sugeriu que a metodologia empregada poderia não estar refletindo a porcentagem de plantas múltiplas presentes nas progênies, a ponto de alterar drasticamente os resultados. Entre as sugestões apresentadas, optou-se pela comparação dos resultados obtidos em teste de germinação e em dissecações (Tabela 23). A técnica de clareamento utilizada por SAVIDAN (1981 e 1982) no estudo genético da apomixia em *P. maximum*, não pôde ser empregada porque todas as gerações já haviam sido obtidas, sendo que nesta metodologia utilizam-se sementes imaturas. A técnica de clareamento foi empregada no estudo da origem do caráter, conforme discutido no item 4.1.2.

Os resultados presentes na Tabela 23 demonstram que o teste de germinação subestimou a porcentagem de poliembrionia nas progênies com alta e baixa taxa de germinação. No caso da progênie A6, as dissecações revelaram uma porcentagem de poliembrionia 4 vezes superior àquela observada em teste de germinação.

As progênies analisadas são resultantes de cruzamentos entre plantas múltiplas e geralmente apresentam uma alta porcentagem de poliembrionia, conforme será discutido no item 4.3.5. Portanto, mesmo tendo ocorrido acentuada redução,

*SAVIDAN, Y.H. (EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisas de Gado de Corte, Campo Grande). Comunicação Pessoal, 1986.

Tabela 23 - Comparação entre a avaliação das progênie quanto a porcentagem de poliembriõnia através de teste de germinação e através de dissecação das sementes.

Identificação da progênie	Dissecação				Teste de Germinação			
	sd	sc	sp	% P	sg	po	pm	% P
A1	50	50	18	36,00	50	45	25	55,56
A2	50	47	14	29,79	50	45	3	6,67
A3	50	50	21	42,00	50	48	6	12,50
A4	50	49	29	59,18	50	48	20	41,67
A5	50	50	5	10,00	50	49	4	8,16
A6	50	46	4	8,70	50	46	1	2,17
A7	50	48	17	35,42	50	44	6	13,64
A8	50	49	33	67,35	50	42	24	57,14
A9	50	50	14	28,00	50	45	6	13,33
A10	50	50	8	16,00	50	49	4	8,16
Total	500	489	163	33,33	500	461	99	21,48

sd = Número total de sementes dissecadas.

sc = Número de sementes consideradas.

sp = Número de sementes poliembriônicas observadas.

%P = Porcentagem de poliembriõnia na progênie.

sg = Número de sementes empregadas no teste de germinação.

po = Número de plântulas observadas.

pm = Número de plântulas múltiplas.

através dos testes de germinação, ela não foi suficiente para impedir o aparecimento de plântulas múltiplas. Entretanto, nas progênes obtidas durante o estudo genético, a frequência de poliembriõnia é baixa, em muitas progênes observou-se apenas uma plântula múltipla. Neste caso a avaliação adotada pode ter subestimado a frequência de plântulas múltiplas por progênie e o número de progênes poliembriônicas, desviando os resultados.

O método de dissecação também pode subestimar a frequência do caráter, como ocorreu na progênie A1. Durante o estudo da embriogênese observou-se que muitas sementes poliembriônicas apresentavam duas plúmulas sob um mesmo coleoptile. Este tipo de semente poliembriônica dificilmente é detectado na dissecação porque visualmente há apenas um eixo embrionário. Além disso, as dissecações em sementes de milho são difíceis de serem realizadas. Após 20 dias de imersão em álcool a 30%, foi possível retirar-se o pericarpo com relativa facilidade, entretanto a aleurona permaneceu aderida ao embrião, dificultando a avaliação.

Entre as duas metodologias comparadas, teste de germinação e dissecação, e a técnica de clareamento empregada no estudo da embriogênese, observou-se que esta última é a que melhor se aplica ao estudo da frequência de plântulas múltiplas em progênes de milho.

4.3.6. Avaliação da frequência de Poliembria em Progenies Poliembriônicas

A partir de plantas múltiplas selecionadas da população ESALQ-POLI-VD2, foram obtidas progenies endogâmicas (S_1), de meios-irmãos e de irmãos-germanos. Autofecundaram-se também plantas únicas que surgiram em progenies poliembriônicas. Os resultados das análises de germinação e frequência de plantas múltiplas nestas progenies encontram-se nas Tabelas 24 e 25.

Observa-se na Tabela 25 que as progenies obtidas de plantas múltiplas, através de autofecundação ou cruzamento, são, em 95% dos casos estudados, também poliembriônicas. As progenies do tratamento XII, denominadas de S_1 mono, foram obtidas através da autofecundação de plantas únicas que originaram-se de progenies poliembriônicas. Das 33 progenies S_1 mono analisadas, 29 eram poliembriônicas. Este fato demonstra que as plantas únicas obtidas de progenies poliembriônicas (P) são fenotipicamente monoembriônicas (M) mas genotipicamente poliembriônicas.

Os resultados também indicam que a frequência ou grau de poliembria varia entre as diferentes progenies e entre progenies de um mesmo cruzamento. Nas Figuras 37 a 41 observa-se a distribuição da frequência de poliembria

Tabela 24 - Número total de progênies endogâmicas (S_1), de meios-irmãos (MI) e de irmãos-germanos (IG) entre plantas múltiplas (Poli), progênies endogâmicas (S_1) de plantas únicas (mono) e progênies de irmãos-germanos entre plantas múltiplas e plantas únicas (poli X mono). Número total de sementes analisadas, de plântulas observadas e porcentagem média ($\bar{M}$) de germinação em cada tratamento.

Tratamento	Identificação	Progênies* obtidas	Total de sementes	Plântulas observadas	$\bar{M}$ de germinação (%)
IX	IG poli	51	2538	2217	87,35
X	MI poli	92	4567	3973	86,99
XI	S_1 poli	73	3649	3151	86,35
XII	S_1 mono	33	1640	1496	91,22
XIII	IG poli X mono	29	1496	1325	88,57
Total		278	13890	12162	87,56

*Todas as progênies foram obtidas através de autofecundação (S_1) e cruzamento controlado (IG) ou livre (MI) de plantas oriundas da população ESALQ-POLI-VD2.

Tabela 25 - Resultados da análise em testes de germinação das progênes endogâmicas (S₁), de meios-irmãos (MI) e de irmãos-germanos (IG) entre plantas múltiplas (poli), progênes endogâmicas (S₁) de plantas únicas (mono) e progênes de irmãos-germanos entre plantas múltiplas e plantas únicas (poli X mono). Número total, porcentagem de progênes poliembrionicas e de plântulas múltiplas observadas em cada tratamento.

Tratamento	Identificação	Progênes ^a obtidas	Taxa ^b M:P	% de progênes poliembrionicas	Total de plântulas múltiplas	Frequência ($\bar{M}$) de plântulas múltiplas(%)
IX	IG poli	51	0:51	100,00	787	35,50
X	MI poli	92	7:85	92,39	1142	28,74
XI	S ₁ poli	73	3:70	95,89	718	22,79
XII	S ₁ mono	33	4:29	87,88	172	11,50
XIII	IG poli X mono	29	0:29	100,00	235	17,74
Total		278	14:264	94,96	3054	25,11

^a Todas as progênes foram obtidas através de autofecundação (S₁) e cruzamento controlado (IG) ou livre (MI) de plantas oriundas da população ESALQ-POLI-VD2.

^b Relação entre o número de progênes monoembrionicas e poliembrionicas em cada tratamento.

Figura 37 - Distribuição da porcentagem de poliembria entre as progênies de meios-irmãos obtidas de plantas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2.

Figura 38 - Distribuição da porcentagem de poliembria entre as progênies de irmãos-germanos obtidas entre plantas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2.

Figura 39 - Distribuição da porcentagem de poliembria entre as progênies endogâmicas (S_1) obtidas de plantas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2.

Figura 40 - Distribuição da porcentagem de poliembriõnia entre as progênies endogâmicas (S₁) obtidas de plantas únicas (monoembriônicas) da população ESALQ-POLI-VD2.

Figura 41 - Distribuição da porcentagem de poliembryonia entre as progênies do cruzamento de plantas múltiplas (poli) com plantas únicas (mono) da população ESALQ-POLI-VD2.

entre as progênies dos tratamentos IX a XIII.

Em cruzamento a frequência média de poliembrionia nas progênies (tratamento IX e X) é superior aquela observvada em autofecundações (tratamentos XI e XII).

As progênies do tratamento XII apresentaram um grau de poliembrionia inferior ao tratamento XI, evidenciando que embora elas sejam genotipicamente poliembrionicas, a não expressão do caráter resultou de um fator que afetou também a frequência de plântulas múltiplas em sua progênie. No tratamento XIII, onde utilizou-se plantas únicas em cruzamento com plantas múltiplas, todas as progênies obtidas foram poliembrionicas, contudo, a frequência média de poliembrionia observada foi inferior aos tratamentos IX, X e XI, onde ambos os parentais eram plantas múltiplas e superior ao tratamento XII, no qual as plantas únicas foram autofecundadas.

Durante a análise das progênies segregantes obtidas para o estudo da herança do caráter (Tabela 22), observou-se que a frequência média de poliembrionia aumentou a medida que as gerações avançavam. Na geração de retrocruzamento, onde controlou-se os cruzamentos em que cada planta F_1 era utilizada como parental masculino ou feminino, com várias plantas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2, observou-se que embora as progênies obtidas fossem todas poliembrionicas, o grau de poliembrionia variava, dependendo da planta múltipla

utilizada com progenitora.

Os cruzamentos recíprocos, realizados na obtenção das gerações F_1 e retrocruzamentos, evidenciaram que não existe influência maternal na expressão do caráter com relação ao número de progênes poliembrionicas e a frequência de poliembrionia nestas.

Todos estes dados obtidos parecem indicar que a frequência de poliembrionia nas progênes é um caráter quantitativo, de herança complexa, controlado por vários genes de efeito aditivo.

As progênes obtidas em cruzamentos de plântulas múltiplas provavelmente apresentam uma frequência média de poliembrionia superior àquelas autofecundadas, porque existe a possibilidade de recombinação de alelos favoráveis à expressão do caráter. Portanto o grau de poliembrionia é influenciado pelo potencial dos parentais em produzirem uma alta ou baixa frequência de plântulas múltiplas na progênie.

A Tabela 26 apresenta resultados da frequência de poliembrionia observada em diferentes tipos de progênes obtidas de plântulas múltiplas irmãs. Portanto o parental feminino foi o mesmo em cada conjunto de plantas múltiplas, variando apenas o polinizador.

Em geral, observa-se nesta Tabela que, sob um

Tabela 26 - Porcentagem de poliembrionia observada em diferentes tipos de progênies obtidas a partir de plantas múltiplas.,

np*	ne	ic	sa	po	pm	P%	np*	ne	ic	sa	po	pm	P%
1	1	MI	50	48	29	60,42	18	1	IG	50	36	18	50,00
	2	MI	50	46	30	65,22		2	IG	50	39	15	38,46
2	1	MI	50	49	5	10,20	19	1	S ₁	50	46	2	4,35
	2	MI	50	49	6	12,25		2	S ₁	50	42	2	4,76
3	1	MI	50	37	17	45,95	20	1	RC	50	46	7	15,22
	2	MI	50	44	11	25,00		2	RC	50	47	2	4,26
4	1	MI	50	50	14	28,00	21	1	RC	50	48	7	14,58
	2	MI	50	50	5	10,00		2	RC	50	48	0	0
	3	MI	50	50	1	2,00		3	RC	50	47	7	14,89
5	1	MI	50	43	21	48,84	22	1	RC	50	49	1	2,04
	2	MI	48	41	20	48,78		2	RC	50	48	0	0
6	1	MI	50	47	4	8,51	23	1	RC	50	50	2	4,00
	2	MI	50	41	10	24,39		2	RC	50	46	1	2,17
	3	MI	50	45	8	17,78	24	1	RC	50	48	3	6,25
7	1	MI	50	27	12	44,44		2	RC	50	46	6	13,04
	2	MI	50	37	12	32,43	25	1	RC	50	48	0	0
8	1	MI	50	48	6	12,50		2	RC	50	47	5	10,64
	2	MI	50	48	1	2,08	26	1	RC	50	50	0	0
9	1	MI	50	32	8	25,00		2	RC	50	50	5	10,00
	2	MI	50	49	20	40,82	27	1	RC	50	50	2	4,00
10	1	MI	50	50	5	10,00		2	RC	50	46	2	4,35
	2	MI	50	48	9	18,75	28	1	RC	50	46	3	6,52
11	1	MI	50	40	5	12,50		2	RC	50	47	4	8,51
	2	MI	38	34	8	23,53	29	1	RC	50	49	6	12,25
	3	MI	50	40	19	47,50		2	RC	50	50	6	12,00
12	1	MI	50	42	29	69,05	30	1	RC	50	41	2	4,88
	2	MI	50	42	32	76,19		2	RC	50	48	1	2,08
	3	MI	50	39	24	61,54	31	1	RC	50	48	2	4,17
13	1	MI	50	38	10	26,32		2	RC	50	48	0	0
	2	MI	50	33	18	54,55	32	1	RC	50	44	10	22,73
14	1	MI	50	47	9	19,15		2	RC	50	50	0	0
	2	MI	50	48	17	35,42	33	1	RC	50	48	6	12,50
15	1	MI	50	41	15	36,59		2	RC	50	44	2	4,55
	2	MI	50	39	12	30,80	34	1	RC	50	48	6	12,50
16	1	MI	41	40	14	35,00		2	RC	50	42	13	30,95
	2	MI	50	46	27	58,70	35	1	RC	50	45	0	0
	3	MI	50	44	20	45,45		2	RC	50	48	0	0
17	1	IG	50	42	24	57,14		3	RC	50	47	0	0
	2	IG	50	45	28	62,22							

Tabela 26 - Continuação.

np*	ne	ic	sa	po	pm	P%	np*	ne	ic	sa	po	pm	P%
36	1	RC	50	47	3	6,38	52	1	MI	50	44	0	0
	2	RC	50	48	4	8,33		2	RC	50	49	1	2,04
								3	RC	50	49	0	0
37	1	RC	50	47	5	10,63		1	MI	50	48	3	6,25
	2	RC	50	48	10	20,83	53	2	RC	50	45	0	0
38	1	RC	50	41	0	0		1	MI	50	41	15	36,59
	2	RC	50	44	0	0	54	2	MI	50	37	26	70,27
39	1	RC	50	49	5	10,20		3	RC	50	48	16	33,33
	2	RC	50	43	0	0							
40	1	RC	50	49	10	20,41	55	1	MI	50	46	6	13,04
	2	RC	50	48	2	4,17		2	RC	50	45	0	0
								3	RC	50	49	9	18,37
41	1	MI	50	50	0	0	56	1	MI	50	49	5	10,20
	2	IG	50	46	15	32,61		2	RC	50	50	0	0
42	1	MI	50	43	3	6,98	57	1	MI	50	48	27	56,25
	2	IG	50	47	1	2,13		2	RC	50	49	1	2,04
43	1	MI	50	47	7	14,89	58	1	MI	50	44	10	22,73
	2	IG	50	49	9	18,37		2	RC	50	49	2	4,08
44	1	MI	50	42	27	64,29	59	1	MI	50	50	0	0
	2	S ₁	50	36	21	58,33		2	RC	50	47	1	2,13
45	1	MI	48	48	0	0	60	1	MI	50	47	8	17,02
	2	RC	50	50	1	2,00		2	RC	50	50	3	6,00
	3	RC	50	49	0	0		3	RC	50	42	3	7,14
46	1	MI	50	37	13	35,14	61	1	MI	50	41	17	41,46
	2	RC	50	47	9	19,15		2	RC	50	36	7	19,44
47	1	MI	50	47	22	46,81	62	1	MI	40	44	15	34,09
	2	RC	50	43	6	13,95		2	MI	50	44	19	43,18
								3	RC	50	47	9	19,15
48	1	MI	50	41	13	31,71		1	MI	50	44	20	45,45
	2	MI	50	44	10	22,73	63	2	RC	50	48	1	2,08
	3	RC	50	46	1	2,17							
49	1	MI	50	41	13	31,71	64	1	IG	50	44	22	50,00
	2	RC	50	47	3	6,38		2	RC	50	46	2	4,35
50	1	MI	50	41	12	29,27	65	1	IG	50	45	5	11,11
	2	RC	50	40	0	0		2	RC	50	47	0	0
	3	RC	50	47	4	8,51							
	4	RC	50	50	0	0	66	1	IG	50	45	35	77,78
	5	RC	50	48	2	4,17		2	RC	50	48	14	29,17
51	1	MI	50	48	13	27,08							
	2	RC	50	50	1	2,00							

*Todas as plantas múltiplas utilizadas nos cruzamentos foram selecionadas da população ESALQ-POLI-VD2; npI - Número da planta = conjunto de plantas múltiplas originadas de uma semente; ne - Número da espiga = uma espiga em cada colmo das plantas múltiplas; ic - Identificação do cruzamento; po - Plântulas observadas; pm - Número de plântulas múltiplas; P% - Porcentagem de poliembrião na progênie; MI - Meios-irmãos; IG - Irmãos-germanos entre diferentes plantas múltiplas; S₁ - Progênie endogâmica; RC - Cruzamento entre a planta obtida a partir de uma semente poliembriônica e uma progênie da geração F₁.

mesmo genótipo maternal, a frequência de poliembria variou na progênie obtida dependendo do polinizador empregado. As progênes resultantes de retrocruzamentos apresentaram em média um menor grau de poliembria que aquelas resultantes de cruzamentos entre plântulas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2. Provavelmente isto foi resultante do menor potencial apresentado pelas plantas da geração F_1 , em gerar plântulas múltiplas, que aquelas da população ESALQ-POLI-VD2. Este potencial é conferido pelo número de alelos favoráveis à expressão do caráter.

PARLEVLIET & CAMERON (1959) observaram que havia genes aditivos controlando o grau de poliembria em progênes poliembriônicas de *Citrus* spp. SAVIDAN (1982) também observou que o total de sexualidade residual em apomíticos facultativos de *P. maximum* era controlado por genes quantitativos, onde a herança era complexa. Em ambos os trabalhos os autores relataram que a frequência do caráter nas progênes estudadas era influenciada pelas condições ambientais.

Como já foi discutido no item 4.3.4., observou-se que na germinação, a competição entre os embriões pode alterar a frequência de plântulas múltiplas, indicando que as condições ambientais, nesta fase, afetam a expressão do caráter. Provavelmente o vigor da planta maternal e as condições ambientais durante a formação das sementes também afetem a ex

pressão do caráter, entretanto não são apresentados dados sobre esta hipótese, uma vez que, para comprová-la, os experimentos precisariam ter sido instalados no campo seguindo-se um delineamento estatístico.

Analizando-se os dados de uma forma global, observa-se que cruzamentos entre plântulas múltiplas resultam em progênies poliembriônicas; cruzamentos entre plantas únicas de progênies monoembriônicas resultam em progênies monoembriônicas; a geração F_1 do cruzamento entre monoembriônicos e poliembriônicos resulta em progênies monoembriônicas, que sob autofecundação segregam para monoembrionia e poliembrionia, sendo que o primeiro fenótipo aparece em maior frequência. Retrocruzamentos com as progênies poliembriônicas resultam em progênies monoembriônicas e poliembriônicas. Cruzamentos entre plantas únicas de progênies poliembriônicas resultam em progênies poliembriônicas. Em todas estas progênies o grau de poliembrionia é variável, sendo maior naquelas resultantes de cruzamentos entre plantas múltiplas.

Em vista destes fatos sugere-se que o caráter poliembrionia em milho é controlado, quanto a presença ou ausência, por um ou dois genes e, quanto a frequência de plântulas múltiplas, por uma série de alelos de efeito aditivo, caracterizando uma herança quantitativa complexa. Além da penetrância incompleta, o caráter apresenta expressivida-

.152.

de variável, conforme discutido nos ítems 4.2.1., 4.2.2. e 4.2.3., não havendo efeito maternal.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no estudo do caráter poliembrionia, presente na população de milho ESALQ-POLI-VD2, estabeleceu-se as seguintes conclusões:

1) A poliembrionia na população estudada é resultante de clivagem e proliferações do pró-embrião, na região apical, durante o início do processo de diferenciação, que ocorre 8 a 9 dias após a polinização;

2) A técnica de clareamento foi eficiente no estudo da embriogênese e na avaliação da porcentagem de plântulas múltiplas em progênies poliembriônicas. Esta técnica é a que melhor reflete a frequência real de poliembrionia, quando comparada aos testes de germinação e dissecações realizadas. O teste de germinação foi a metodologia mais ineficiente, tendo subestimado a porcentagem de plântulas múltiplas nas progênies avaliadas;

3) As análises do teor de óleo indicaram que não existem diferenças entre a porcentagem de óleo das sementes monoembriônicas e poliembriônicas de uma mesma progênie. Sendo assim, o caráter poliembrionia presente na população ESALQ-POLI-VD2 não tem valor para o melhoramento de milho, visando a elevação do teor de óleo;

4) Os estudos do número de progênies poliembriônicas entre progênies segregantes, obtidas a partir do cruzamento da população ESALQ-POLI-VD2 com linhagens contrastantes para o caráter poliembrionia, sugerem que a presença ou ausência do caráter é controlada por um ou dois genes. Os cruzamentos recíprocos sugerem que não há efeito maternal;

5) A penetrância incompleta e variável, observada em progênies obtidas a partir de plantas múltiplas e o comportamento destas progênies, com relação ao grau de poliembrionia em diferentes cruzamentos, sugerem que a frequência de poliembrionia nas progênies poliembriônicas é controlada por uma série de genes de efeito aditivo, que caracterizam uma herança quantitativa complexa, sendo influenciada pelo ambiente;

6) As análises fenotípicas realizadas em diferentes estágios do desenvolvimento das plantas múltiplas indicaram que o caráter apresenta expressividade variável em re

lação ao tipo e número de plântulas por semente poliembriônica;

7) Não foram realizadas contagens do número de cromossomos suficientes para estabelecer se ocorrem ou não haplóides. Embora o tipo de poliembrionia presente na variedade ESALQ-POLI-VD2 não favoreça o aparecimento de haplóides, a grande variação fenotípica observada entre as plantas múltiplas de uma semente, parece não ser resultante unicamente da competição entre elas. Desta forma são necessários estudos detalhados, sob este aspecto, para determinar se durante a diferenciação dos embriões múltiplos ocorrem falhas no proceso mitótico que poderiam gerar plantas haplóides, aneuplóides ou poliplóides.

6. LITERATURA CITADA

- AHMAD, Q.N.; BRITTEN, E.J.; BYTH, D.E. Haploid soybeans, a rare occurrence in twin seedlings. *J. Hered.*, Washington, 68(1):67, 1977.
- BASU, A.K. & BASU, R.K. Radiation induced morphological abnormalities in rice (*Oryza sativa* L.). *Trans. Bose Res. Inst.*, Calcutta, 31(4):151-5, 1968. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 54(10):568, 1974. (Resumo).
- BEVERSDORF, W.D. & BINGHAM, E.T. Male-sterility as a source of haploids and polyploids of *Glycine max.* *Can. J. Genet. Cytol.*, Quebec, 19(2):283-7, 1977.
- BORISENKO, V.A. Study of the frequency of polyembryony in *Triticum aestivum*, *T. durum* and rye. *Ref. Z.*, URSS, 12.55.136, 1977. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 50(2):108, 1980. (Resumo).

BORISENKO, V.A.; SHAMRAI, A.F.; GUMMENNYI, V.G.; DUBINA, O.G.

Frequency of the occurrence of twin plants in wheat. *Refer. Z.*, URSS, 9.55.43, 1975. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 47(8):613, 1977. (Resumo).

BURKMAKINA, N.V. The phenomenon of polyembryony in some

varieties of winter wheat. *Refer. Z.*, URSS, 7.65.268, 1978. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 50(2):112, 1980. (Resumo).

BURKMAKINA, N.V. & ZHELEZNOV, A.V. Spontaneous polyembryony

in some bread-wheat varieties. *Refer. Z.*, URSS, 10.55.149, 1976. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 48(4):272, 1978. (Resumo).

CAMERON, D.R. Inheritance in *Nicotiana tabacum*. XXII.

Investigations on multiple seedlings. *Amer. J. Bot.*, New York, 36(7):526-9, 1949.

CAMERON, J.W. & SOOST, R.K. Sexual and nucellar embryony in

F₁ hybrids and advanced crosses of *Citrus* with *Poncirus*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, Geneva, 104(3):408-10, 1979.

CHEN, L.F.O.; HEER, H.E.; PALMER, R.G. The frequency of

polyembryonic seedlings and polyploids from m₄₁ soybeans. *Theor. Appl. Genet.*, Berlin, 69(3):271-7, 1985.

- CHRISTENSEN, H.M. & BAMFORD, R. Haploids in twin seedlings of pepper. *J. Hered.*, Whashington, 34(4):99-105, 1943.
- COE, Jr. E.H. A line of maize with high haploid frequency. *Am. Naturalist*, Lancaster, 93:381-2, 1959.
- CONWAY, T.F. & EARLE, F.R. Nuclear magnetic resonance for determining oil content of seeds. *J. Amer. Oil Chemists Soc.*, Illinois, 40(2):265-8, 1963.
- COOPER, D.C. Haploid-diploid twin embryos in *Lilium* and *Nicotiana*. *Amer. J. Bot.*, New York, 30(6):408-13, 1943.
- DEWEY, D.R. Polyembryony in *Agropyron*. *Crop Sci.*, Madison, 4(3):313-7, 1964.
- ENDRIZZI, J.E. Cytogenetics of four sets of twin in cotton. *J. Hered.*, Whashington, 50(5):222-6, 1959.
- FARQUHARSON, L.I. Apomixis and polyembryony in *Tripsacum dactyloides*. *Amer. J. Bot.*, New York, 42(8):737-43, 1955.
- FOKINA, E.A. The frequency of polyembryony in the progeny of maize-*Tripsacum* apomicts. *Refer. Z.*, URSS, 7.65.45, 1978. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 50(1):31, 1980. (Resumo).
- FOSKETT, R.L. Polyembryonic tomatoes, a possible research tool. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, Beltsville, 76:548-554, 1960.

- FRANSEN, N.O. Polyembryonie bei der kartoffel. Z.
Pflanzenzucht., Berlin, 59(4):343-58, 1968.
- GOLOVIN, V.P. Efficacy of using haploids in breeding for
heterosis. In: GENETIKOV I SELEKSIONEROV UKRAINY,
Odessa, 1981. *Tez. dokl.*, 4 kiev, 1981, p.134-5. Apud
Plant Breed. Abst., Cambridge, 52(12):944, 1982. (Resumo).
- HERR JUNIOR, J.M. A new clearing-squash technique for the
study of ovule development in angiosperms. *Amer. J.*
Bot., New York, 58(8):785-90, 1971.
- INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS. Milho. In:
Primera memoria anual, 1965, Santiago, p.108. Apud
Plant Breed. Abst., Cambridge, 40(2):309, 1970. (Resumo).
- IWAMASA, M.; UENO, I.; NISHIURA, M. Inheritance of nucellar
embryony in *Citrus*. *Bul. Hort. Res. Ster. Japan.*, Series
B, Shimizu, 7:1-8, 1967.
- JUDIN, B.F. & HVATOVA, M.N. Cytogenetic study of twin plants
in diploid and tetraploid maize. *Genetika*, Moscow, 4:131-7,
1965. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 36(3):495, 1966.
(Resumo).
- JUDIN, B.F. & HVATOVA, M.N. Polyembryony in diploid and
polyploid maize. *Refer. Z.*, Nauk., p.202-13, *Abst.*,
7.55.55, 1968. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge,
40(1):36, 1970. (Resumo).

- KENWORTHY, W.J.; BRIM, C.A.; WERNSMAN, E.A. Polyembryony in soybeans. *Crop Sci.*, Madison, 13(6):637-9, 1973.
- KERMICLE, J.L. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize. *Amer. J. Bot.*, New York, 58(1):1-7, 1971.
- KIESSELBACH, T.A. False polyembryony in maize. *Amer. J. Bot.*, New York, 13(1):33-6, 1926.
- KIESSELBACH, T.A. The structure and reproduction of corn. *Research Bulletin*. UNIVERSITY OF NEBRASKA COLLEGE OF AGRICULTURE. Agricultural Experiments Station, Lincoln, (161):51-84, nov., 1949.
- KOUL, A.K. Cytoembryological studies of oriental Maydeae II. *Chionachne koenigii* Thwaites. *Ann. No. Nat. Acad. Sci.*, India, p.156 (*Abst.*), 1966. *Apud Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 40(1):123, 1970. (*Resumo*).
- KRAEVOI, S. Ya & OKHRIMENKO, G.N. Induction of mutations in winter wheat at various stages of embryogenesis. In: KONFERENTSIYA PO S-KH RADIOLOGII, 1, Obninsk, 1979. *Tez. dokl.*, Moscow, 1979, p.91. *Apud Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 50(6):413, 1980. (*Resumo*).

- KRAEVOI, S. Ya; OKHRIMENKO, G.N.; LEBED'KOVA, F.P. Effect of X rays on proembryos and embryos of winter wheat. *Tsitologiya i Genetika*, Moscow, 11(2):132-5, 1977. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 47(12):953, 1977. (Resumo).
- KUTUBIDZE, V.V. The phenomenon of polyembryony in thea. *Refer. Z.*, URSS, 11.V3.51, 1974. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 45(6):376, 1975. (Resumo).
- MAHESHWARI, P. Polyembryony. In: MAHESHWARI, P., *An introduction to the embryology of angiosperms*. New York, McGraw-Hill, 1950. cap.10, p.343-56.
- MAJUMBER, B. Induced polyembryony and twin seedlings in rice by X-ray and ^{32}P . *Trans. Bose Res. Inst.*, Calcutta, 32(3-4):105-8, 1969. Apud *Plant Breed Abst.*, Cambridge, 44(2):59, 1974. (Resumo).
- MARSHALL, H.H. Polyembryony in tomatoes. *Can. J. Plant Sci.*, Quebec, 38(1):67-72, 1958.
- MENDES, A.J.T. Observações citológicas em *Coffea*. *Bragantia*, Campinas, 4(12):693-708, 1944.
- MORGAN JUNIOR, D.T. & RAPPLEYE, R.D. A study of polyembryony in *Capsicum frutescens*. *J. Hered.*, Whashington, 41(4):91-5, 1950.

- MORGAN JUNIOR, D.T. & RAPPLEYE, R.D. Polyembryony in maize and lily. *J. Hered.*, Whashington, 42(2):90-3, 1951.
- MORGAN JUNIOR, D.T. & RAPPLEYE, R.D. A cytogenetic study of the origin of multiple seedlings of *Capsicum frutescens*. *Amer. J. Bot.*, New York, 41(7):576-85, 1954.
- MURRAY, B.E. Diploid, aneuploid and triploid plants from haploid X diploid crosses in flax (*Linum usitatissimum*). *Can. J. Genet. Cytol.*, Quebec, 22(4):591-7, 1980.
- NISHIYAMA, I.; TABATA, M.; FORSBERG, R.A.; SHANDS, H.L. Twinning and chromosome anomalies in Kanota oats. *Crop Sci.*, Madison, 8(5):603-6, 1968.
- OWEN, F.V. Soybeans seeds with two embryos. *J. Hered.*, Whashington, 19(8):373-4, 1928.
- PARLEVLIET, J.E. & CAMERON, J.W. Evidence on the inheritance of nucellar embryony in *Citrus*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, St. Joseph, 74:252-60, 1959.
- PESEV, N. & PETROVIC, R. Study of possibility in raising maize inbred lines with two embryos. *Theor. Appl. Genet.*, Berlin, 47(4):197-201, 1976.

- POGNA, N. & MARZETTI, A. Frequency of two tubes *in vitro* germinated pollen grains. *Maize Genet. Coop. News.*, Columbia, 51:44, 1977.
- POPE, M.N. Cleavage polyembryony in barley. *J. Hered.*, Whashington, 34(2):153-4, 1943.
- POWELL, J.B. & BURTON, G.W. Polyembryony in pearl millet. *Crop Sci.*, Madison, 8(6):771-3, 1968.
- POWELL, J.B.; HANNA, W.W.; BURTON, G.W. Origin, cytology, and reproductive characteristics of haploids in pearl millet. *Crop Sci.*, Madison, 15(3):389-92, 1975.
- RAMIAH, K.; PARTHASARATHY, B.A.; RAMANUJAN, B.A. Polyembryony in rice (*Oryza sativa*). *Ind. J. Agric. Sci.*, New Delhi, 5(2):119-24, 1935.
- RANDALL, T.E. & RICK, C.M. A cytogenetic study of polyembryony in *Asparagus officinalis*, L. *Amer. J. Bot.*, New York, 32(9):560-9, 1945.
- RANDOLPH, L.F. Developmental morphology of the caryopsis in maize. *J. Agric. Res.*, Whashington, 53(12):881-916, 1936.
- RAO, P.N. & VENKATESWARLU, J. Studies on the occurrence and relationship of multiples styles, double seeds and twin seedlings in *Coix aquatica*. *Maydica*, Bergamo, 21(4):145-55, 1976.

- ROSS, W.M. & WILSON, J.A. Polyembryony in *Sorghum*. *Crop Sci.*, Madison, 9(12):842-3, 1969.
- SARKAR, K.R. & COE JUNIOR, E.H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. *Genetics*, Baltimore, 54:453-64, 1966.
- SAVIDAN, Y. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.). In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS LEXINGTON KY, 14, Lexington Ky, 1981. *Proceedings*. Lexington Ky, 1981. p.182-4.
- SAVIDAN, Y. Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. *Travaux et Documents de L'O.R.S.T.O.M.*, OSTOM, Paris, (153):1-159, 1982.
- SEHGAL, C.B. *In vitro* induction of polyembryony in *Ammi majus* L. *Current Sci.*, Bangalore, 41(7):263-4, 1972.
- SHNAIDER, T. & SIL'VERE, A.P. Polyembryony in swepe rape. *Bioloogiya*, Estonian SSR, 23(3):267-70, 1974. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 55(1):45, 1975. (Resumo).
- SILOW, R.A. & STEPHENS, S.G. "Twinning" in cotton. *J. Hered.*, Whashington, 35(3):76-8, 1944.

- SILVA, J.; MAGNAVACA, R.; FREIRE, A.B. Poliembrionia no milho "*Dentado Composto*". *Pesq. Agrop. Bras.*, Série Agronomia, Brasília, 6:103-7, 1971.
- STEBBINS, G.L. Apomixis in relation to variation and evolution. In: STEBBINS, G.L. *Variation and evolution in plants*. New York, Columbia Univ. Press, 1950. cap.10, p.380-419.
- SULINOWSKIS, S.; WISNIEWSKA, H.; SEKOWSKA, K. Frequency of spontaneous polyploids in *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. In: THE UTILIZATION OF GENETIC RESOURCES IN FODDER CROP BREEDING, Aberystwyth, 1982. *Proceedings*, Poznan, Welsh Plant Breeding Station, 1983, p.55-9. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 54(2-3):116, 1984. (Resumo).
- TALIAFERRO, C.M. & BASHAW, E.C. Inheritance and control of obligate apomixis in breeding Buffelgrass, *Pennisetum ciliare*. *Crop Sci.*, Madison, 6(5):473-6, 1966.
- TERZIISKI, D.; KHRISTOV, M. Chromosome number and the origin of twin plants obtained from apomictic populations of *Poa palustris* L. and *P. nemoralis* L. *Genetika i Selektsiya*, URSS, 14(5):354-9, 1981. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 53(3):215, 1983. (Resumo).

- THÉVENIN, L. Les problèmes d'Amélioration chez *Asparagus officinalis* L. *Ann. Amélior. Plantes*, Paris, 18(4):327-65, 1968.
- THOMPSON, T.E. Haploid breeding technique for flax. *Crop Sci.*, Madison, 17(7):757-60, 1977.
- TURKOV, V.D.; NUSHIKYAN, V.A.; DRODOVA, N.S. Spontaneous mutations in the caryotypes of vegetables crops. *Doklady Vsesoyuznoi Ordenar Lenina Akademii Sel'skokhozyaistvennykh Nauk Imeni V.I. Lenina*, s.l., 12:15-6, 1973. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 44(7):389, 1974. (Resumo).
- TYRNOV, V.S. & ENALEENA, N. Kh. Autonomous development of the embryo and endosperm in maize. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, Nauk, 272(3):722-5, 1983. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 54(12):886, 1984. (Resumo).
- VARSHANINA, T.P. Polyembryony in solanaceous vegetable crops and in onion. *Byulleten Vsesoyuznogo Ordena Lenina Instituta Rastenievodstvo Imeni N.I. Vavilova*, Leningrad, 33:90-8, 1973. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 44(4):231, 1974. (Resumo).

- VARSHANINA, T.P. The phenomenon of polyembryony in solanaceous vegetable crops and onion. *Genetike i Selectsii*, Leningrad, 60(2):128-33, 1977. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 49(6):427, 1979. (Resumo).
- VISHVESHWARA, S. & CHINNAPPA, C.C. Embryological studies in *Coffea arabica* L. *Turrialba*, Turrialba, 15(4):307-16, 1965.
- WARDLAW, C.W. Embryogenesis in flowering plants: special section. In: WARDLAW, C.W. *Embryogenesis in plants*. New York, John Wiley & Sons, 1955. cap.14, p.252-93.
- WEBBER, J.M. Cytology of twin cotton plants. *J. Agric. Res.*, Whashington, 57(2):155-60, 1938.
- WEBBER, J.M. Polyembryony. *Bot. Rev.*, Lancaster, 6(11):575-98, 1940.
- WILSON, J.A. & ROSS, W.M. Haploidy in twin seedlings of winter wheat, *Triticum aestivum*. *Crop Sci.*, Madison, 1(1):82, 1961.
- YOUNG, W.J. Potatoes ovules with two embryo sacs. *Amer. J. of Bot.*, New York, 9(5):213-4, 1922.

ZHELEZNOV, A.V.; ZHELEZNOV, N.B.; OSIPOVA, G.M. Spontaneous polyembryony in *Bromus inermis* Leyss. *Refer. Z.*, URSS, 7.65.50, 1978. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 50(1):47, 1980. (Resumo).

ZVERZHANSKAYA, L.S.; GRISHINA, E.V.; KOMAROVA, P.I.
Cytoembryological study of highly haploid maize lines. *Genetika*, URSS, 13(6):969-72, 1977. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 47(12):969, 1977. (Resumo).

ZVERZHANSKAYA, L.S.; GRISHINA, E.V.; KOMAROVA, P.I.
Cytoembryological study of haploidy and polyembryony in restitution lines of maize. *Tsitologiya i Genetika*, URSS, 14(4):3-9, 1980. Apud *Plant Breed. Abst.*, Cambridge, 52(4):259, 1982. (Resumo).

169

169.

169

7. APENDICE

APÊNDICE 1 - Resultados da análise do teor de óleo das sementes mono e poliembriônicas.

Nº da pro gênie	M da % de óleo das sementes			M do peso das sementes (mg)			M da quantidade de óleo (mg) das sementes		
	Monoembriõ nicas	Poliembriõ nicas	M da pro gênie	Monoembriõ nicas	Poliembriõ nicas	M da pro gênie	Monoembriõ nicas	Poliembriõ nicas	M da pro gênie
T 1	5,05	4,15	4,60	216,53	226,21	221,37	10,93	9,39	10,16
T 2	4,88	4,69	4,79	171,76	190,58	181,17	8,38	8,94	8,66
T 3	5,06	4,93	4,99	293,56	289,65	291,60	14,85	14,28	14,57
T 4	4,50	4,78	4,64	196,63	212,64	204,64	8,85	10,16	9,51
T 5	5,49	5,46	5,47	274,46	284,32	279,39	15,07	15,52	15,30
T 6	4,83	4,81	4,82	340,05	330,30	335,18	16,42	15,89	16,16
T 7	4,53	4,06	4,30	147,64	160,05	153,85	6,69	6,50	6,60
T 8	5,10	4,64	4,87	310,65	319,63	315,14	15,84	14,83	15,34
T 9	4,99	4,17	4,58	157,35	160,55	158,95	7,85	6,70	7,28
T 10	5,12	4,97	5,05	233,82	267,06	250,44	11,97	13,27	12,62
T 11	4,57	4,47	4,52	152,86	150,75	151,81	6,99	6,74	6,87
T 12	5,29	5,48	5,39	253,81	241,87	247,84	13,43	13,25	13,34
T 13	4,53	4,40	4,46	264,14	282,34	273,24	11,97	12,42	12,20
T 14	4,85	4,62	4,74	264,81	265,30	265,05	12,84	12,26	12,55
T 15	5,13	5,35	5,24	198,72	204,92	201,82	10,19	10,96	10,58
T 16	4,90	4,63	4,77	268,43	258,31	263,37	13,15	11,96	12,56
T 17	5,25	5,11	5,18	300,71	310,68	305,70	15,79	15,88	15,84
T 18	4,25	4,09	4,17	229,07	243,01	236,04	9,74	9,94	9,84
T 19	4,46	4,63	4,54	175,89	195,99	185,94	7,85	9,07	8,46
T 20	4,58	4,22	4,40	257,70	258,00	257,85	11,80	10,89	11,35
T 21	4,40	4,41	4,41	293,97	273,39	283,68	12,93	12,06	12,50
T 22	4,76	4,63	4,69	351,08	360,14	355,61	16,71	16,67	16,69
T 23	4,73	4,68	4,71	314,02	291,78	302,90	14,85	13,66	14,26
T 24	5,32	4,58	4,95	186,34	197,27	191,81	9,91	9,03	9,47
T 25	4,88	4,39	4,64	163,45	181,82	172,63	7,98	7,98	7,98
T 26	4,39	4,33	4,36	329,03	323,65	326,34	14,44	14,01	14,23
T 27	4,62	3,91	4,26	236,35	224,96	230,66	10,92	8,80	9,86
T 28	4,14	4,16	4,15	177,06	173,09	175,08	7,33	7,20	7,27
T 29	4,77	4,55	4,66	150,67	153,91	152,29	7,19	7,00	7,10
T 30	4,66	4,97	4,81	259,00	257,16	258,08	12,07	12,78	12,43
M Geral	4,80	4,61	4,71	238,99	242,98	240,99	11,50	11,27	11,39

APÊNDICE 2 - Número de sementes com 2 a 7 plântulas e número total de semente poliembrionicas por progênie de irmãos-germanos entre plantas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2.

np	Nº de plântulas por semente						sp
	2	3	4	5	6	7	
G1	7	9	2				18
G2	1						1
G3	1				1		2
G4	10	4	2				16
G5	19	2	2				23
G6	4	3					7
G7	11	1	3				15
G8	12	10	3				25
G9	6	3	2				11
G10	7	2					9
G11	16	9	8	4	1		38
G12	22	4					26
G13	11	2	1				14
G14	15	1					16
G15	15	3	2				20
G16	9						9
G17	16	11	4	1			32
G18	6	2					8
G19	13	8	4				25
G20	10	6					16
G21	13	3	2				18
G22	19	1	2				22
G23	16	5	2				23
G24	10	1					11
G25	11	1					12
G26	9	8					17
G27	11	2	1	1			15
G28	8	1					9
G29	12	4					16
G30	3	1					4
TOTAL	323	107	40	6	2		478

np = Número da progênie.

sp = Número total de sementes poliembrionicas na progênie.

APÊNDICE 3 - Número de sementes com 2 a 7 plântulas e número total de sementes poliembriônicas por progênie endogâmica (S₁) de plantas múltiplas da população ESALQ-POLI-VD2.

Nº de plântulas por semente							sp	Nº de plântulas por semente							sp					
ip	2	3	4	5	6	7		ip	2	3	4	5	6	7						
E1	3	1					4	E35	4	2	1				7					
E2	9	3					12	E36	10	2	2				14					
E3	3	2					5	E37	8	4	1				13					
E4	1						1	E38	7						7					
E5							0	E39							0					
E6	5	5					10	E40	9	1					10					
E7	14	9					23	E41	7		1				8					
E8	16	3	1				20	E42	5		1				6					
E9	3	5					8	E43	6	3					9					
E10	2						2	E44	16	4					20					
E11	1						1	E45							0					
E12	7	1	1				9	E46	12	7					19					
E13	15	1					16	E47	12	4					16					
E14	16	3	2				21	E48	3			1			4					
E15	7	2					9	E49	8	1					9					
E16	3	1					4	E50	1						1					
E17	13	5	1				19	E51	3	1					4					
E18	1						1	E52	16		1				17					
E19	10	4	1				15	E53	5						5					
E20	2	1					3	E54	4	2					6					
E21	4	1		1			6	E55	11	2					13					
E22	15	2					17	E56	14	8	1			1	24					
E23	13	3	5				21	E57	1						1					
E24	4						4	E58	5	1					6					
E25	8						8	E59	6						6					
E26	5	1					6	E60		1					1					
E27	10	3	1				14	E61	5	1			1		7					
E28	22	2					24	E62	4	1					5					
E29	14	1	1				16	E63	1		1				2					
E30	8	15					23	E64	10	3	2				15					
E31	1	1					2	E65	3	1					4					
E32	2	1					3	E66	2	2	2				6					
E33	10	4	1				15	E67	7	3	1				11					
E34	3						3	TOTAL						455	134	28	2	1	1	621

ip = Número de progênie.

sp = Número total de sementes poliembriônicas na progênie.