VARIAÇÃO NUMÉRICA DE CROMOSSOMOS EM MILHO
AUTOTETRAPLÓIDE (*Zea mays* L.)

ROSITA BENÍTEZ PORTILLO

Orientador: DR. GERHARD BANDEL

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1980

*À minha mãe, à minha família
e aos meus amigos,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos:

Ao Professor Dr. Gerhard Bandel pela orientação e es
tímulos constantes dedicados a este trabalho.

Ao Professor Dr. Ernesto Paterniani, pelas valiosas
sugestões e pelas facilidades concedidas como Diretor do Instituto
de Genética.

Ao Ministério de Agricultura e Pecuária do Paraguai
pela bolsa de estudos concedida através do Projeto Integrado de De-
sarrollo Agropecuário do Paraguai.

Ao Instituto Interamericano de Cooperação Agrícola pe
las facilidades outorgadas no que se refere à parte administrativa.

Ao Instituto Agronômico Nacional do Paraguai pela per
missão outorgada para a realização deste curso.

Ao colega Isaias O. Geraldi pelas sugestões nas aná-
lises estatísticas.

Às colegas Maria Suely Pagliarini e Maria Isabel de
Oliveira Penteado pela amizade e valiosa colaboração.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pela companhia
e apoio recebidos.

Aos professores e funcionários do Instituto de Gené-
tica da ESALQ, que de várias maneiras colaboraram para a realização
deste trabalho.

Í N D I C E

	Pág.
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 - Número Básico de Cromossomos	7
3.2 - Aspectos Gerais dos Poliplóides	8
3.3 - Autotetraplóides de Milho	11
3.3.1 - Ocorrência natural	11
3.3.2 - Métodos de indução	11
3.3.3 - Comportamento meiótico	16
3.3.4 - Diploidização	24
3.3.5 - Caracteres morfológicos	28
3.3.6 - Utilização em melhoramento	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 - Material	31
4.2 - Métodos	32
4.2.1 - Preparações citológicas e coleta de dados ..	32
4.2.1.1 - Meiose em células-mãe de pólen ..	32
4.2.1.2 - Mitose em pontas de raízes	33
4.2.2 - Observações de campo e coleta de dados	35
4.2.2.1 - Cruzamento e autofecundação	35
4.2.2.2 - Determinação da altura de planta, altura da primeira espiga e número de folhas por planta	36

	Pág.
4.2.2.3 - Determinação do número de sementes por espiga	36
4.2.3 - Análise estatística dos dados	37
4.2.3.1 - Análise para avaliar o número de cromossomos	37
4.2.3.2 - Análise da variância das variâncias do número de cromossomos	38
4.2.3.3 - Análise da variância dos caracte- res agronômicos estudados	39
5. RESULTADOS	40
5.1 - Variação Numérica de Cromossomos	40
5.1.1 - Contagem de cromossomos	40
5.1.2 - Associações cromossômicas	42
5.2 - Caracteres Agronômicos	43
5.2.1 - Altura de planta	43
5.2.2 - Altura da primeira espiga	44
5.2.3 - Número de folhas por planta	44
5.2.4 - Número de sementes por espiga	44
6. DISCUSSÃO	53
6.1 - Variação Numérica de Cromossomos	53
6.2 - Caracteres Agronômicos	56
6.3 - Comportamento Meiótico	59
6.3.1 - Nucléolos	59

	Pág.
6.3,2 - Ocorrência de univalentes	59
6.4 - Métodos de Indução	61
7. CONCLUSÕES	64
8. SUMMARY	67
9. RÉSUMÉ	70
10. LITERATURA CITADA	73
APÊNDICE I	80

LISTA DE TABELAS

TABELA		Pág.
1	Emparelhamento ao acaso dos quatro cromossomos homólogos em uma planta autotetraplóide (SYBENGA, 1972, p. 247).	20
2	Coeficiente (F) de endocruzamento para altura de planta, comprimento de espiga e peso de espiga em híbridos duplos, híbridos simples, F_2 , F_3 e linhas de milho autotetraplóide (LEVINGS <i>et alii</i> , 1967, p. 73)..	29
3	Variação numérica de cromossomos baseada nas observações microscópicas de células de microsporócitos de milho autotetraplóide ($4n = 40$). Piracicaba, 1979 ..	41
4	Variação numérica de cromossomos baseada nas observações microscópicas de células de microsporócitos de milho autotetraplóide ($4n = 40$) (SHAVER, 1960, p. 60)	41
5	Análise da variância das variâncias transformadas em $\log_{10} s^2$, do número de cromossomos de cada planta, para as 24 famílias de milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979.....	82
6	Análise da variância do número de cromossomos por família e por planta dentro de família em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979	82
7	Frequência média de associação quadrivalente (IV), bivalente (II) e monovalente (I) por célula, número médio de cromossomos por célula para as três associa-	

TABELA

Pág.

	ções cromossômicas e porcentagem de associação cromossômica por célula em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979	83
8	Associação cromossômica quadrivalente (IV) na fase de diacinese tardia em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979	84
9	Associação cromossômica bivalente (II) na fase de diacinese tardia em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979	85
10	Associação cromossômica monovalente (I) na fase de diacinese tardia em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979	86
11	Análise da variância da altura de plantas em 22 famílias de milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979 ...	86
12	Análise da variância da altura da primeira espiga em 22 famílias de milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979	87
13	Análise da variância do número de folhas por planta, transformado em $\sqrt{X}$, em 22 famílias de milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979	87
14	Número de sementes por espiga, provenientes de autofecundação, "SIB" e polinização livre (15 espigas por tratamento) em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Pág.
1	Técnica para estabelecimento de milho autotetraplóide pelo método <i>el</i> (elongate) (ALEXANDER, 1957, p. 40)	14
2	Diacinese em microsporócitos de milho autotetraplóide ($4n = 40$) mostrando 1 VIII, 7 IV e 2 II. Piracicaba, 1979	45
3	Diacinese em microsporócitos de milho autotetraplóide ($4n = 40$) mostrando 8 IV e 4 II. Piracicaba, 1979	46
4	Diacinese em microsporócitos de milho autotetraplóide ($4n = 40$) mostrando 7 IV e 6 II. Piracicaba, 1979	47
5	Metáfase em célula somática de raiz de milho autotetraplóide ($4n = 40$) mostrando 40 cromossomos. Piracicaba, 1979	48
6	Anáfase I em microsporócitos de milho autotetraplóide mostrando cromossomos retardatários. Piracicaba, 1979	49
7	Número de sementes por espiga provenientes de autofecundação, "SIB" e polinização livre (15 espigas por tratamento) em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979	50
8	Espigas provenientes de autofecundação em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979	51
9	Espigas provenientes de polinização livre em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979	51

FIGURA		Pág.
10	Espigas provenientes de "SIB" em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979	52
11	Tétrada em microsporócitos de milho autotetraplóide mostrando duas das células filhas com 2 nucléolos e as outras duas com 1 nucléolo. Piracicaba, 1979 ..	60

1. RESUMO

A contagem do número de cromossomos nos microsporócitos de milho autotetraplóide, foi realizada em 71 plantas, num total de 1.420 células na fase de diacinese tardia. Os resultados mostraram que 60,56% das células estudadas tinham 40 cromossomos; verificou-se que o número de cromossomos por célula oscilou de 36 a 42.

Na maioria dos microsporócitos observados predominava o emparelhamento de cromossomos na forma de bivalentes e tetravalentes, notando-se raramente a presença de univalentes. Trivalentes não foram observados. Cromossomos retardatários na anáfase I evidenciaram a existência de univalentes. Estas observações indicaram que há uma distribuição irregular dos cromossomos na meiose do milho autotetraplóide, para as células filhas.

Do total de células observadas, 64,85% dos cromossomos estavam associados formando tetraivalentes, 34,51% formando bivalentes e 0,64% formando univalentes. Observa-se que aproximadamente $\frac{2}{3}$ dos cromossomos do milho autotetraplóide estavam associados formando tetraivalentes nos microsporócitos, sendo que os bivalentes correspondem aproximadamente ao $\frac{1}{3}$ restante dos emparelhamentos cromossômicos meióticos desse material.

Configurações em anel ou em cadeia foram observadas frequentemente na meiose dos milhos autotetraplóides estudados, mas também detectaram-se outras configurações. A maior frequência de configurações em anel, com segregação alternada na anáfase, observada em milhos autotetraplóides, explica o fato de se obter em média 60% de euplóides com 40 cromossomos, em várias pesquisas realizadas por diversos autores.

No paquíteno observou-se sempre um único nucléolo, enquanto que nas díadas foram encontrados frequentemente dois nucléolos em cada núcleo, indicando a presença de dois cromossomos 6 de milho. Observaram-se também tétradas com duas de suas células binucleoladas e duas células uninucleoladas que provavelmente provêm de um microsporócito aneuplóide onde estava faltando um cromossomo 6. O fato de que no paquíteno não se observaram nunca dois nucléolos leva a concluir que eles estão fundidos nesta fase.

As 24 famílias de milho autotetraplóide estudadas mostraram plantas com um desenvolvimento relativamente vigoroso, mas

com uma altura média de 1,16 m, considerada de porte baixo. A altura média da primeira espiga foi de 0,52 m. O número médio de folhas por planta foi de 9,27. As espigas também foram de tamanho pequeno, sendo que as autofecundadas, "sibs" e de polinização livre produziram, em média, 105, 116 e 137 sementes viáveis por espiga, respectivamente. Nessas espigas autotetraplóides observaram-se frequentemente grãos inviáveis, vazios e defeituosos, que provavelmente originam-se de gametas estéreis aneuplóides, sendo que o número de sementes viáveis por espiga atingiu até um máximo de 321.

A redução da fertilidade observada nas populações de milhos autotetraplóides estudadas no presente trabalho, e também observada por vários pesquisadores, é consequência inevitável da segregação irregular dos cromossomos na anáfase I, que forma gametas não balanceados, produzindo aborto de pólen consequentemente.

A indução de "diploidização", ou seja, a obtenção de 20 bivalentes, do material autotetraplóide através da irradiação, é um campo aberto de pesquisa com novas perspectivas para o uso do milho autotetraplóide em programas de melhoramento.

2. INTRODUÇÃO

A poliploidia é um fenômeno comum entre as plantas cultivadas, o que vem demonstrar a sua grande importância na evolução das espécies. Ela consiste numa variação natural ou induzida que se expressa no aumento ou na diminuição do número de cromossomos de um organismo vivo.

Em milho e nos vegetais, em geral, a poliploidia foi estudada em indivíduos poliplóides de ocorrência natural, até que em 1937, foi descoberto o papel exercido pela colchicina como indutora de poliploidia pela inibição do fuso cromático na divisão celular. Isto veio facilitar muito os estudos com a rápida obtenção de novos indivíduos poliplóides em grande quantidade.

A utilidade da poliploidia como uma ferramenta no melhoramento vegetal tem se tornado mais evidente aos agrônomos nos

últimos anos, sendo que o sucesso de poliplóides em floricultura e fruticultura é um fato reconhecido. Um impedimento para se usar em larga escala essa técnica em programas de melhoramento envolvendo as gramíneas, tem sido a dificuldade da produção de tetraplóides.

Em milho foi usado primeiramente um método de indução de poliploidia pelo tratamento por calor (RANOLPH, 1932). O uso da colchicina na indução de poliplóides no milho não foi muito eficiente, segundo RHOADES (1955). Estudos posteriores demonstraram que os poliplóides podem ser obtidos também geneticamente utilizando-se o efeito de determinados genes (ALEXANDER, 1957; RHOADES e DEMPSEY, 1966b; KERMICLE, 1969; CHASE, 1969). Níveis de poliplóides maiores que tetraplóides foram obtidos por RHOADES e DEMPSEY (1966b), utilizando o mutante *el* (elongate). Eles obtiveram uma série inteira de poliplóides incluindo plantas $3n$, $4n$, $5n$, $6n$ e $7n$, e concluíram que os tetraplóides são os mais fáceis para manter e utilizar experimentalmente. Recentemente, com o advento de uma nova técnica de indução de poliploidia, a cultura de tecidos, a obtenção de poliplóides tornou-se mais acessível (CRÓCOMO, 1978).

A planta de milho tetraplóide lembra a diplóide em altura e hábito de crescimento, mas tem folhas mais largas, colmo mais robusto, pendões maiores, e espigas e grãos de tamanho aumentado (RHOADES, 1955).

Tetraplóides não são tão férteis quanto os diplóides dos quais se originaram e as espigas geralmente não são bem grana-

das (RANDOLPH, 1935; RHOADES, 1955; WARFIELD, 1956; SHAVER, 1961, 1962; LEVINGS *et alii*, 1967). No entanto, SEMENOV *et alii* (1973a, 1973b), irradiando sementes de milho autotetraplóide, conseguiram plantas com 16 a 18 bivalentes. ENKEN (1973) menciona que híbridos simples e duplos entre milho tetraplóide irradiado e não irradiado, mostraram heterose para fertilidade.

Os trabalhos realizados evidenciam a possibilidade da utilização de milho tetraplóide em melhoramento. No presente trabalho, quando se refere a tetraplóides, estão sendo mencionados sempre autotetraplóides e não alotetraplóides.

O presente estudo tem como objetivo comparar a variação numérica de cromossomos entre as progênes de diferentes famílias de milho autotetraplóide e observar a manifestação fenotípica dos caracteres agronômicos, tais como altura de planta, altura da primeira espiga, número de folhas por planta e número de sementes por espiga.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Número Básico de Cromossomos

KATO (1975) menciona uma série de estudos realizados para se conhecer o número básico de cromossomos em milho, que foi determinado em $X = 10$ desde o início das investigações em 1911. Menciona também que para os muitos casos em que o número achado era maior, ficou depois esclarecido que os cromossomos extra-numerários eram do tipo B, os quais não pertenciam à qualquer dos cromossomos normais, tendo uma morfologia e comportamento completamente diferentes.

Segundo o mesmo autor, embora se conheça bastante sobre o comportamento citológico e efeito genético dos cromossomos B, sua origem é ainda desconhecida.

3.2 - Aspectos Gerais dos Poliplóides

Os poliplóides originam-se das variações no número básico de cromossomos que ocorrem na natureza e envolvem a duplicação ou perda de conjuntos inteiros de cromossomos ou de somente alguns cromossomos.

Cerca da metade das espécies das angiospermas tem o número de cromossomos que claramente indicam origem poliplóide, e em algumas famílias como das gramíneas, 3/4 das espécies são poliplóides (STEBBINS, 1949; GRANT, 1963).

Muitos trabalhos já foram feitos com respeito à poliploidia em milho, tanto com euplóides como com aneuplóides. Em séries euplóides, onde o complemento gamético é totalmente adicionado ou subtraído, o número da série diplóide pode ser diminuído ou aumentado. Os diferentes níveis de ploidia foram exaustivamente estudados com fins genéticos e de melhoramento.

As plantas monoplóides, as quais têm um conjunto de cromossomos ou genoma, surgem espontaneamente pelo desenvolvimento partenogenético de óvulos não fertilizados ou, em raros casos, têm origem androgenética pelo desenvolvimento de um núcleo espermático no citoplasma do saco embrionário (RHOADES, 1955).

Plantas monoplóides de milho aparecem espontaneamente em taxas de 1 por 1000 a 2000 sementes (CHASE, 1969; KERMICLE, 1969; CARLSON, 1977).

CHASE (1969) e KERMICLE (1969, 1971) consideram a importância do mutante *ig* (indeterminate gametophyte) na obtenção de monoplóides. Com o advento da nova técnica de cultura de tecidos, foi demonstrado por THOMAS *et alii* (1979) que é possível obter-se plantas haplóides de milho a partir do pólen.

A grande importância dos monoplóides em milho, reside na possibilidade de serem usados para obtenção de diplóides perfeitamente homozigotos, o que pode ser de grande valor para estudos citogenéticos e para uso no melhoramento genético. Esta última possibilidade tem sido tentada por vários autores, embora não tenha apresentado, até agora, resultados satisfatórios.

Os triplóides que aparecem em populações diplóides, usualmente provêm da fertilização de um óvulo diplóide por um gameta haplóide, mas, eventualmente, o macho pode contribuir com o número diplóide de cromossomos (RHOADES, 1936).

Triplóides com 30 cromossomos somáticos e aneuplóides com número de cromossomos variando de 26 a 34 são produzidos intercruzando milho diplóide e autotetraplóide (PUNYASHING, 1947).

ALEXANDER e BECKETT (1963) mencionam que plantas triplóides aparecem ocasionalmente em culturas diplóides de milho sendo que as espigas dessas plantas podem facilmente ser identificadas em triagem em instalações comerciais de produção de semente, já que elas são obviamente aberrantes; tais espigas são normalmente descartadas. Eles constataram que a frequência de óvulos não reduzidos va

riava de 0,58 a 5,23 por 1.000 gametas.

RHOADES e DEMPSEY (1966b) encontraram triplóides na progênie de plantas homozigotas para o gene *e_l* (elongate), onde ocorre supressão duma divisão meiótica.

Segundo CARLSON (1977), nos triplóides os cromossomos estão comumente associados na metáfase I como trivalentes e é menos frequente ocorrerem como bivalentes ou univalentes. A grande maioria dos gametas são aneuplóides, com número cromossômico oscilando de 11 a 19. Muitos desses gametas são inviáveis, e os triplóides apresentam tipicamente uma alta porcentagem de óvulos e grãos de pólen abortados. A baixa fertilidade do milho triplóide é uma consequência inevitável da segregação de grupos de três cromossomos.

Ploidias maiores foram obtidas por RANDOLPH (1932) por tratamentos com calor. RHOADES e DEMPSEY (1966b) obtiveram uma série inteira de poliplóides em milho, incluindo plantas 3n, 4n, 5n, 6n e 7n, utilizando o mutante *e_l* (elongate).

Todavia, o trabalho experimental com poliplóides é principalmente restrito para autotetraplóides, desde que ele é o mais simples poliplóide para manter e utilizar experimentalmente (RHOADES e DEMPSEY, 1966b; CARLSON, 1977).

3.3 - Autotetraplóides de Milho

3.3.1 - Ocorrência natural

O estudo de milhos tetraplóides tem progredido lentamente devido à sua ocorrência não frequente sob condições naturais (RANDOLPH, 1932; LEVINGS *et alii*, 1967).

Segundo JACKSON (1976), os tetraplóides naturais, formados usualmente em baixa frequência, estão sujeitos à competição durante os primeiros estágios com os diplóides, sendo difícil chegar à maturidade. Uma vez alcançada a maturidade, o tipo de reprodução torna-se um importante fator para a manutenção da tetraploidia. Os tetraplóides autógamos não têm dificuldade de estabelecimento e só depende da sua fertilidade e amplitude genética. No entanto, tetraplóides alógamos são dependentes de isolamento físico, fisiológico ou ecológico para o seu estabelecimento.

3.3.2 - Métodos de indução

Muito se tem feito para conseguir um método eficiente para indução de poliploidia tanto em milho como para outras plantas.

Assim, existem trabalhos que demonstraram a possibilidade de se induzir poliploidia, por exemplo, em tecidos somáticos por ferimentos, cortes, enxertia, etc., mas estes têm aplicação restrita às plantas de propagação vegetativa.

a) Alta temperatura

O primeiro trabalho a ter um maior sucesso na obtenção de poliplóides em milho foi o realizado por RANDOLPH (1932). O autor realizou uma série de experimentos com alta temperatura, com o propósito de desenvolver uma técnica para produzir tetraplóides em milho. Num experimento que pode ser citado como representativo de uma série de experimentos similares, 104 raízes tratadas a 45°C por uma hora foram examinadas e 15 delas continham um ou mais setores de tecidos 4n. Tratamentos sucessivos aplicados às raízes em intervalos de quatro horas aumentaram bastante o número de setores 4n num dado número de raízes.

Tendo assim obtido uma técnica efetiva, para induzir tetraploidia em meristemas de raízes, tratamentos similares foram aplicados ao zigoto e embrião numa tentativa de produzir indivíduos inteiros com números múltiplos de cromossomos. Isto foi conseguido pela aplicação local de calor em primórdios de espiga. Este método foi bastante eficiente na indução de poliploidia.

b) Colchicina

A colchicina provou ser relativamente ineficiente na indução de linhagens poliplóides no milho (RHODES, 1955).

SUMNYJ (1964) conseguiu formas tetraplóides pelo tratamento com colchicina de híbridos simples, as quais apresentaram grãos de pólen e estômatos maiores que os diplóides originais. Ain-

SUMNYJ (1955) relata que dos métodos testados para obtenção de tetraplóides, o que deu melhores resultados foi a aplicação de solução de colchicina a 0,2% em gemas de plântulas de dois a três centímetros.

PATERNIANI e DIMARZIO (1967) induziram poliploidia em milho, aplicando soluções de colchicina nas espigas após a polinização, e em sementes. Estes autores obtiveram algumas plantas poliplóides, o que foi verificado através do teste dos estômatos, mas o método não se mostrou eficiente.

c) Gene *el* (elongate)

Um método genético bastante interessante de induzir tetraploidia em milho foi o desenvolvido por ALEXANDER (1957), que conseguiu produzir tetraplóides com o emprego do gene *el* recessivo, o qual causa a produção de óvulos não reduzidos quando homozigoto.

O material de milho estudado no presente trabalho origina-se destes tetraplóides obtidos por Alexander.

O método, que é ilustrado na Figura 1, consiste em converter diplóides em tetraplóides, tornando-os homozigotos para *el* por retrocruzamento (RC) seguido de cruzamento teste (CT) e autofecundação e então polinizando com autotetraplóides estabelecidos. A simples autofecundação de plantas *el/el* não é caminho satisfatório para desenvolver tetraplóides desde que plantas sem um alelo dominante no locus em questão, produzem óvulos não reduzidos.

- Passo 1 $+/+ \times el/el \rightarrow el/+$
WF9
- Passo 2 (RC₁) $+/+ \times el/+ \rightarrow 1\ el/+ : 1\ +/+$
WF9 planta 1 planta 2
- Passo 3 (RC₂) $+/+ \times el/+ \rightarrow 1\ el/+ : 1\ +/+$
WF9 planta 1 planta 3 planta 4
- (CT₁) $el/+ \times el/el \rightarrow 1\ el/el : 1\ el/+$
planta 1 (polinizadas com σ^4n)
- (RC₂) $+/+ \times +/+ \rightarrow$ todas $+/+$
WF9 planta 2
- (CT₂) $+/+ \times el/el \rightarrow$ todas $el/+$
planta 2 (polinizadas com σ^4n)
- Passo 4 Continua os retrocruzamentos dos heterozigotos (planta 3, etc.) com WF9
- Passo 5 Autofecundação das progênes dos retrocruzamentos:
 $1\ +/+ \rightarrow$ todas $+/+$ (descartadas)
 $1\ el/+ \rightarrow 1\ +/+ : 2\ el/+ : 1\ el/el$
- Passo 6 As progênes autofecundadas do passo 5 são polinizadas com pólen autotetraploide estabelecido.

Figura 1 - Técnica para estabelecimento de milho autotetraplóide de pelo método *el* (elongate) (ALEXANDER, 1957, p.40).

Segundo estudos realizados por RHOADES e DEMPSEY (1966b), os óvulos não reduzidos originam-se ou por supressão da segunda divisão meiótica, ou de uma replicação cromossômica extra, durante a interfase entre a primeira e segunda divisão de meiose. A hipótese mais simples da supressão da segunda divisão é favorecida muito mais em relação à de uma replicação adicional, mas, os dados genéticos são consistentes com as duas hipóteses.

NEL (1970) achou que o gene *el* possui numerosos efeitos quando homozigoto. Estes incluem, produção de óvulos não reduzidos em proporções variadas com óvulos haplóides, aborto de pólen e de óvulo, desenrolamento dos cromômeros, formação de neocentrômeros esporádicos e influência em crossing-over. Estas observações justificam a necessidade de se manter plantas portadoras do alelo dominante *El* nesse locus, conforme o delineamento de ALEXANDER (1957).

d) Cultura de tecidos

CROCOMO (1978) considera que uma das vantagens da cultura de tecidos, entre outras, é a indução de poliploidia.

Pela técnica de cultura de tecidos ou de células *in vitro*, pode-se obter indivíduos com variação de ploidia em relação à população original de células (HANDRO, 1978).

DHALIWAL e KING (1979) afirmam que culturas de tecidos geralmente sofrem drásticas mudanças no número de cromossomos que variam desde um simples aumento no nível de ploidia a diferen-

tes graus de aneuploidia. Trabalhando com cultura de milho haplóide a partir do Coe Stock 6 e yg 2, estes autores analisaram a distribuição de ploidia na cultura após 3 meses e encontraram células triplóides, tetraplóides e grande número de células diplóides, além de encontrarem "callus" com setores mistos diplóides e tetraplóides. A determinação da ploidia foi feita através de contagem de cromocentros.

Assim a técnica da cultura de tecidos constitui por si só, uma fonte de indução de tetraplóides, de forma "espontânea". Além disso, da mesma forma como é possível diploidizar haplóides, pode-se tetraploidizar diplóides ou mesmo haplóides.

3.3.3 - Comportamento meiótico

A meiose é um sistema altamente integrado, caracterizado por uma ordenada sequência de eventos tais como emparelhamento, recombinação, formação de quiasmas e disjunção, que culmina na redução do número de cromossomos nos gametas.

a) Nucléolos

RHOADES e DEMPSEY (1966b) observaram nas díadas de milho autotetraplóide dois nucléolos, indicando a presença dos dois cromossomos 6.

b) Distribuição irregular dos cromossomos

RANDOLPH (1935) observou irregularidades na distribuição dos cromossomos na meiose, que deve ser levada em conta para a inconstância do número de cromossomos observado na progênie de milho tetraplóide. O autor observou que os 40 cromossomos estavam arranjados na metáfase I usualmente em grupos quadrivalentes e bivalentes, sendo que os trivalentes e univalentes raramente eram notados. As figuras anafásicas usualmente eram regulares, com 20 cromossomos passando para um polo e 20 para o outro. Em quatorze das vinte e uma anáfases contadas, cada grupo continha 20 cromossomos, em seis casos a disjunção era de 19 a 21 e em um caso ela foi de 18 a 22. Cromossomos univalentes retardatários no meio e no fim da anáfase e primeiros estágios da telofase foram observados em raros casos.

Observações parecidas são dadas por KADAM (1948), CATCHESIDE (1956) e SHAVER (1960), que trabalharam com 429, 74 e 325 plantas de milho autotetraplóides, respectivamente. Destas observações, SHAVER conclui que populações de milho autotetraplóide permaneciam estáveis dentro da faixa de 36 a 43 cromossomos, estando representada por 60% aproximadamente a classe euplóide com 40 cromossomos.

DAS (1970) e SEMENOVA *et alii* (1971) observaram agrupamentos irregulares com formações quadrivalentes e bivalentes e algumas configurações octovalentes em milho autotetraplóide. Observaram também movimento retardatário de cromossomos na anáfase I.

c) Formação de quadrivalentes

Quanto ao número médio de quadrivalentes por célula, KADAM (1948) achou os valores de $7,58 \pm 1,3$; $8,56 \pm 1,3$ e $7,6 \pm 1,8$ para três populações de milho autotetraplóide.

MORRISON e RAJHATHY (1960) determinaram uma média de 4,3 quadrivalentes num estudo da meiose em sete cereais e gramíneas autotetraplóides, onde todas as linhagens tinham $4n = 28$ cromossomos. Isto significa que cerca de $2/3$ dos cromossomos estavam unidos como quadrivalentes. MORRISON e RAJHATHY mencionam também que proporções similares de cromossomos estavam associados como quadrivalentes em linho autotetraplóide ($4n = 60$) e milho autotetraplóide ($4n = 40$).

ALLARD (1967) considera que, à parte do genótipo do esporófito, os fatores que influenciam na produção gamética nos autotetraplóides são: 1) a regularidade com que são formados os quadrivalentes e 2) a disjunção mais ou menos ao acaso dos quadrivalentes.

d) Emparelhamento

O tipo de emparelhamento vai depender do número de pontos de iniciação do emparelhamento. Se houver só um ponto de início para cada par, formar-se-ão dois bivalentes e se houver dois pontos em cada par formar-se-á um quadrivalente (SYBENGA, 1972). Segundo o mesmo autor, dados os 4 cromossomos homólogos seguintes

e considerando-se todas as possibilidades dos cromossomos se emparelharem ao acaso, haverá formação de seis quadrivalentes e três pares de bivalentes, conforme ilustra a Tabela 1, ou seja, 2/3 dos cromossomos estar-se-ão unidos como quadrivalentes.

O emparelhamento ao acaso dos 4 cromossomos homólogos, explica os resultados obtidos por KADAM (1948) e MORRISON e RAJHATHY (1960) com respeito ao número médio de quadrivalentes em populações autotetraplóides, que foram citados no item anterior.

e) Configurações

As configurações dependem da frequência de quiasmas, do grau de terminalização e do tipo de emparelhamento. SHAVER(1960) achou que mais de 2/3 dos arranjos em milho tetraplóide na fase de diacinese estavam em alguma configuração diferente de anel ou cadeia. Entretanto, DAS (1970) observou, também na diacinese de milho tetraplóide, que todos os cromossomos formavam uma cadeia zig-zag, devido à afinidade entre os cromossomos. Os estudos de SYBENGA(1975) sobre configurações quadrivalentes em várias espécies autotetraplóides, revelaram uma maior frequência de configurações em anel com segregação alternada na anáfase. As configurações em anel dão, ou se-

Tabela 1 - Emparelhamento ao acaso dos quatro cromossomos homólogos em uma planta autotetraplóide (SYBENGA, 1972, p. 247)^{a/}.

CROMOSSOMOS				
		a_1		b_1
		a_2		b_2
		a_3		b_3
		a_4		b_4
		$b_1 - b_2$	$b_1 - b_3$	$b_1 - b_4$
		$b_3 - b_4$	$b_2 - b_4$	$b_2 - b_3$
$a_1 - a_2$	II + II	IV	IV	
$a_3 - a_4$				
$a_1 - a_3$	IV	II + II	IV	
$a_2 - a_4$				
$a_1 - a_4$	IV	IV	II + II	
$a_2 - a_3$				

^{a/} De cada cromossomo ambos os braços são representados 4 vezes. Quando o emparelhamento começa na parte terminal do cromossomo, cada braço tem 3 possibilidades: a_1 pareia com a_2 (então a_3 pareia com a_4); a_1 pareia com a_3 (a_2 com a_4); a_1 pareia com a_4 (a_2 com a_3). O mesmo acontece com b. Quando a troca entre homólogos é ao acaso entre os 2 pontos onde inicia o emparelhamento em cada cromossomo, há um total de 9 combinações, todas com a mesma possibilidade de ocorrência. Dessas, 3 darão 2 bivalentes (II + II) e 6 darão 1 quadrivalente (IV). Quando o emparelhamento inicia em segmentos interticiais, mais quadrivalentes podem ser formados.

gregação adjacente com 3 cromossomos homólogos para um polo e 1 para outro, ou segregação alternada com 2 cromossomos homólogos orientando-se para cada polo.

Os resultados obtidos por SYBENGA seriam os mais aceitáveis para explicar os 60%, em média, de euplóides com 40 cromossomos obtidos por vários pesquisadores em populações de milho autotetraplóide.

f) Formação de quiasmas

O quadrivalente tem influência no grau de fertilidade do milho autotetraplóide. A razão disto é a segregação irregular que pode ocorrer na anáfase I e resultar em gametas aneuplóides. Há dois casos de segregações irregulares: 1) orientação desigual, resultando segregação 3:1 e 2) redução da frequência de quiasmas que conduz a uma alta frequência de univalentes. Isso mostra o quanto importante é a frequência de quiasmas para a fertilidade.

VENKATESWARLU (1964), numa análise das configurações da metáfase I de milho autotetraplóide, observou que 74% dos multivalentes possíveis são formados. Ele considerou uma necessidade essencial para formações de multivalentes a existência de uma ou mais trocas de parceiro na associação no paquíteno, seguida por formação de um número apropriado de quiasmas, distribuídas ao longo dos cromossomos pareados na associação. Segundo o mesmo autor, embora os pontos de troca mostrem uma distribuição ao acaso, eles mostram a

tendência a se enrolar em certas regiões do cromossomo, tais como centrômero, knob, e as extremidades dos cromossomos ou com regiões adjacentes a elas.

Um estudo do comportamento meiótico de milho autotetraplóide com cromossomo 10 anormal (K10), que apresenta cromatina adicional, foi realizado por SNOPE (1967). Ele observou que configurações quadrivalentes com extremidades livres, isto é, com os braços dos cromossomos não envolvidos no quiasma terminal, foram reduzidas de uma frequência de 46% no controle com 4 cromossomos 10 normais, para 36% em plantas com 1 ou 2 cromossomos 10 anormais. Isto foi interpretado como que a presença do cromossomo 10 anormal influenciou no aumento do número de quiasmas. Segundo RHOADES (1942), a presença do K10 produz segregação preferencial durante a megasporogênese, sendo que mais de 70% dos óvulos recebem o cromossomo anormal em vez dos 50% esperados, para segregação ao acaso. Pólen K10 somente em parte tem sucesso em competir com pólen que possui cromossomo 10 normal. Sugeriu-se que a cromatina extra presente no cromossomo anormal produz um efeito deletério no crescimento do tubo polínico.

RHOADES e VILKOMERSON (1942) determinaram que a presença do K10 produz configurações parecidas à J e V na anáfase com formação de neocentrômeros.

KIKUDOME (1959) e RHOADES e DEMPSEY (1966a) afirmam que a segregação preferencial somente pode ocorrer na presença de K10.

Se bem que a frequência de quiasmas é muito importante para a fertilidade no milho tetraplóide, e a presença do K10 influencia no aumento do número de quiasmas, foi visto que não pode ser empregado com esta finalidade devido aos efeitos deletérios que ele apresenta.

g) Fertilidade

RANDOLPH (1935) achou que a redução de fertilidade varia de 5 a 20% em milhos autotetraplóides. GILLES e RANDOLPH (1951), trabalhando com milho autotetraplóide, observaram um decréscimo na média de 8,47 para 7,46 quadrivalentes por célula depois de dez gerações de seleção para fertilidade. Segundo RANDOLPH (1935), linhagens autotetraplóides de milho não são tão férteis como as linhas diplóides das quais elas eram derivadas, e que cruzamentos entre linhas diplóides e tetraplóides eram altamente incompatíveis.

Descendências de milho tetraplóide cruzadas ao acaso, isto é, plantas euplóides cruzadas com plantas aneuplóides, muito se aproximam a populações de potencial agrônômico, conforme foi observado por SHAVER (1960). Ainda SHAVER (1961) considera que pode ser esperada uma relação positiva entre esterilidade de uma planta de milho autotetraplóide e seu grau de aneuploidia. Ele testou a fertilidade dos pólenes e dos óvulos de 356 plantas de milho Flint argentino $4n$ com número de cromossomos oscilando de 38 a 42 e as comparações de teste F revelaram que todas as classes de aneuplóides di

feriam significativamente da classe de 40 cromossomos, mas não diferiam entre si.

Segundo LEVINGS *et alii* (1967), a combinação de autofecundação e esterilidade inerente produz plantas com muito pouca capacidade de produzir sementes.

3.3.4 - Diploidização

Segundo RANDOLPH (1935) o milho autotetraplóide pode ser mantido sob condições naturais de campo junto com o milho diplóide comum sem uma apreciável taxa de hibridação. O alto grau de incompatibilidade mostrado pelo milho tetraplóide em cruzamentos com diplóides pode ser atribuído mais a diferenças cromossômicas quantitativas do que a diferenças cromossômicas qualitativas, desde que os estoques $4n$ induzidos têm os mesmos genes do seu diplóide parental, com os quais eles subsequentemente provaram ser estéreis nos cruzamentos. Conforme as observações de RANDOLPH, os estoques tetraplóides se cruzam entre eles dando descendências tetraplóides, sem reversão de ploidia, tendo sido observado durante muitas gerações de cruzamentos.

O trabalho de GILLES e RANDOLPH (1951) demonstra a possibilidade de que multivalentes em milho autotetraplóide podem gradualmente serem substituídos por sinapses bivalentes regulares. Eles consideram que os tetraplóides experimentais originalmente formam multivalentes tipicamente verdadeiros pelo pareamento ao acaso

dos cromossomos que são suficientemente homólogos para uma sinapse livre. Essas associações multivalentes podem não persistir indefinidamente em gerações sucessivas, podendo desaparecer ou gradualmente ou talvez abruptamente e ser substituídas por sinapses bivalentes regulares. A mudança de sinapse multivalente para bivalente pode ser resultado de uma diferenciação gradual dos cromossomos de modo que eles não apresentam por longo tempo o grau de homologia essencial para a formação de multivalentes. Ou então um gene mutante pode ser responsável pela mudança.

O desenvolvimento de estoques de milho autotetraplóide de 1934 a 1937 e a propagação de um desses estoques como uma linhagem separada de 1938 a 1947, forneceu material para uma comparação da frequência dos cromossomos multivalentes no início e no fim deste período de dez anos (GILLES e RANDOLPH, 1951).

O estoque autotetraplóide foi semeado durante dez anos e a descendência de cada geração era cruzada ou por polinização manual ou, mais frequentemente, pela polinização cruzada natural em parcelas isoladas de 5.000 a 15.000 plantas. Cada ano as plantas eram selecionadas para vigor, fertilidade, resistência à doença e outros caracteres desejáveis.

As plantas analisadas citologicamente por GILLES e RANDOLPH (1951) correspondiam aos lotes semeados em 1948 com sementes remanescentes da colheita de 1937 e sementes da colheita de 1947. Somente foram incluídas aquelas células nas quais todos os cromos-

somos podiam ser analisados com relação à sua associação sináptica quadrivalente ou bivalente. Havia mais quadrivalentes por célula na média no início do período de dez anos do que no fim do período, sendo o decréscimo de 8,47 para 7,46 quadrivalentes por célula.

A interpretação mais óbvia dos dados, segundo os mesmos autores, é que a seleção das plantas mais **vigorosas** e férteis como estoques de sementes durante cada uma das dez gerações, resultou na seleção de um gene ou genes que influenciam a associação cromossômica, os quais podem ter estado presentes numa condição heterozigota no início do experimento. Esta é a explicação mais plausível do que se assumir a ocorrência de uma mutação durante o período de dez anos.

GILLES e RANDOLPH (1951) consideraram que a demonstração de uma mudança na direção de uma frequência de associação quadrivalente diminuída, e um aumento correspondente na associação bivalente normal dos cromossomos no milho autotetraplóide na diacinese, durante um período de dez anos, são tendências significativas do ponto de vista evolutivo, em relação à poliploidia. Nesse estudo, foi mostrado experimentalmente, pela primeira vez, que tal mudança ocorre.

MORRISON e RAJHATHY (1960) não concordam que ocorre uma tendência para a bivalência em autotetraplóides, devido a que em gerações avançadas de muitos autotetraplóides diferentes induzidos, eles não encontraram qualquer redução na frequência de quadrivalentes.

Por outro lado, BINGHAM (1965) observou que a alfafa autotetraplóide produz principalmente bivalentes na meiose e que muitas linhagens de milho $4n$ observadas em Minnesota produziam dois ou mais bivalentes, presumindo que o número crescerá com o tempo, através da diploidização.

DAS (1970) observou na célula-mãe do grão de pólen em milho autotetraplóide induzido experimentalmente, que formação de bivalentes era frequente chegando até um máximo de oito numa célula que apresentava três grupamentos diferentes: 8 II, 2 IV e 2 VIII.

Esses estudos todos significam que autopoliplóides com seus característicos tipos multivalentes de associações cromossômicas na época da sua origem podem, com a passagem do tempo, mudar para o tipo bivalente regular de associação na meiose, que é característica dos organismos diplóides e alopoliplóides altamente férteis.

Observações semelhantes foram também relatadas em outras culturas (GOTTSCALK, 1976).

SEMENOV *et alii* (1973a) irradiaram sementes de milho autotetraplóide com raios-X e cruzaram as plantas irradiadas entre si, como também com outras não irradiadas, acompanhada de uma rigorosa seleção e conseguiram híbridos com 16 a 18 bivalentes por célula. Ainda SEMENOV *et alii* (1973b) trataram sementes de milho autotetraplóide com raios- γ nas doses de 10KR por três gerações conse-

cutivas. A irradiação e também hibridação com seleção periódica, levaram a um aumento na frequência de bivalentes na meiose.

3.3.5 - Caracteres morfológicos

Conforme as observações de RANDOLPH (1935) e RHOADES (1955), o milho tetraplóide lembra o diplóide quanto à altura e hãbitos de crescimento, mas têm folhas mais largas, caules mais fortes, pendões mais largos e espigas e grãos de tamanho aumentado, se bem que as espigas geralmente não são bem granadas. Os mesmos autores verificaram que um aumento do tamanho celular acompanha a duplicação cromossômica no milho, com o resultado que o pólen, as células epidérmicas e estômatos, assim como as células em outras partes das plantas $4n$, são proporcionalmente maiores do que aquelas das plantas diplóides, das quais elas derivaram.

LEVINGS *et alii* (1967) estudaram o efeito da autofecundação e da hibridação em milho autotetraplóide para três caracteres agronômicos: altura da planta, comprimento da espiga e peso da espiga. O resultado obtido foi na seguinte ordem: híbrido duplo > híbrido simples > F_2 > F_3 > linhagens, conforme o ilustra a Tabela 2. As linhagens possuíam esterilidade e uma falta de vigor. A combinação de autofecundação e esterilidade inerente em espécies alógamas resulta em plantas com muito pouca capacidade de produzir sementes. O aumento da autofecundação resultou num decréscimo significativo na altura da planta, comprimento da espiga e peso da espiga.

Tabela 2 - Coeficiente (F) de endocruzamento para altura da planta, comprimento de espiga e peso de espiga em híbridos duplos, híbridos simples, F_2 , F_3 e linhas de milho autotetraplóide. (LEVINGS *et alii*, 1967, p. 73).

TRATAMENTOS	F	Altura da planta ^{a/}	Comprimento da espiga ^{a/}	Peso da espiga ^{b/}
Híbridos duplos	0,0889	182,6	21,2	206,4
Híbridos simples	0,2667	174,2	20,0	170,5
F_2	0,3890	165,9	19,0	146,4
F_3	0,4909	158,5	18,2	128,4
Linhagens	0,8000	138,4	15,8	77,4

^{a/} Centímetros; ^{b/} Gramas.

3.3.6 - Utilização em melhoramento

O milho autotetraplóide, potencialmente fértil e com características morfológicas desejáveis, tais como pendões largos e espigas e grãos de tamanho aumentado, pode se tornar economicamente importante.

Um impedimento para se usar mais largamente em programas de melhoramento tem sido a dificuldade da produção de tetraplóides e a sua ocorrência natural muito baixa.

O método de ALEXANDER (1957), de indução de tetraploidia em milho com o emprego do gene *el*, proporcionou ótimos resultados. O mesmo autor propõe também que melhoramento e testes de capacidade específica de combinação sejam realizados num nível te-

traplóide, assim como têm sido realizados no nível diplóide.

Num estudo realizado por SHAVER (1960) foi demonstrado que descendências de milho autotetraplóide cruzadas ao acaso, isto é, plantas euplóides cruzadas com plantas aneuplóides, muito se aproximam a populações de potencial agronômico.

SHAVER (1962) conclui que populações de milho autotetraplóide permaneciam estáveis dentro da faixa de 36 a 43 cromossomos, estando representada por 60% aproximadamente a classe euplóide, com 40 cromossomos.

SEMENOV *et alii* (1973a; 1973b) conseguiram milhos autotetraplóides com 16 a 18 bivalentes por célula, através de irradiação de sementes, fato muito importante que permite aumentar enormemente a fertilidade desses materiais.

Todos estes trabalhos realizados evidenciam a possibilidade da utilização de milho autotetraplóide em melhoramento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Material

O material estudado no presente trabalho (*Zea mays* L.), origina-se dos autotetraplóides obtidos por ALEXANDER (1957) e provêm de Lonnquist, Department of Agronomy Madison, U.S.A. Foram introduzidos ao Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em 1976, pelo Professor João Rubens Zinsly.

As sementes foram plantadas no campo experimental do Instituto de Genética da ESALQ, em Piracicaba, durante o ano agrícola 1977/1978. Foram realizados cruzamentos em cadeia, entre as plantas disponíveis, sendo que a planta 1 foi o pai da planta 2; a planta 2 foi o pai da planta 3, e assim por diante. Selecionaram-se 112 plantas.

No dia 11 de novembro de 1978, semearam-se 24 famí-

lias que correspondem a 24 progênies de plantas cruzadas em 1977. Cada família constituiu uma parcela representada por uma linha de 10 m de plantio e espaçamento de 0,20 m entre covas e 1,00 m entre linhas.

Alguns problemas de germinação ocorreram, oscilando o número de plantas por família de 3 a 42.

As inflorescências masculinas foram coletadas entre o dia 28 de dezembro de 1978 e 6 de janeiro de 1979, para estudo citológico.

4.2 - Métodos

4.2.1 - Preparações citológicas e coleta de dados

4.2.1.1 - Meiose em células-mãe de pólen

As inflorescências masculinas foram fixadas durante 24 horas em Carnoy (3 partes de álcool absoluto e 1 parte de ácido acético glacial). Após esse período, o material foi transferido para álcool 70% por mais 24 horas, e em seguida, transferido para novo álcool 70%. O material foi conservado a 5°C, até o momento de ser utilizado.

O preparo de lâminas foi feito colocando-se uma antera grande na lâmina e sobre ela, uma gota de carmin acético a 1%. A antera foi seccionada com o auxílio de uma lanceta, depois levemente comprimida para a expulsão dos microsporócitos; a seguir to-

dos os fragmentos de antera foram removidos, ficando apenas microsporócitos na lâmina. Em seguida foi colocada a lamínula sobre o material e aquecida levemente na chama. O excesso de corante que fluuiu sob a lamínula foi retirado com papel de filtro, ao mesmo tempo esmagando-se suavemente o material.

A contagem de cromossomos foi feita imediatamente após o preparo da lâmina, utilizando-se número variável de plantas por família, conforme o material disponível coletado no campo.

Em cada planta foram contados os cromossomos em 20 células na fase de diacinese tardia, ou seja, quando na lâmina aparecia a proporção aproximada de uma célula em diacinese para uma célula em metáfase.

Surgiu um problema metodológico referente à exata determinação do número de cromossomos, durante as análises citológicas, porque houve dificuldades de se distinguir os tipos de emparelhamentos cromossômicos.

Os valores obtidos nas contagens foram expressos como número médio de cromossomos em cada cinco células ao acaso, com um total de quatro médias para cada planta.

4.2.1.2 - Mitose em pontas de raízes

Algumas sementes remanescentes do material que foi plantado no campo, foram submetidas à germinação, em laboratório, para aproveitamento de suas raízes no estudo mitótico dos cromossomos.

As raízes foram cortadas e tratadas com colchicina 0,2% durante 6 horas, e logo fixadas em Carnoy durante 24 horas. Após esse período, o material foi transferido para álcool 70% e conservado em congelador até o momento de ser utilizado.

Antes de preparar as lâminas, o material foi lavado em água destilada, hidrolizado em HCl 1N a 60°C, durante 8 minutos, e lavado novamente. Após este tratamento foi colocado em reativo de Schiff, em frasco escuro, por 45 minutos e logo lavado em água corrente por 10 minutos.

O preparo das lâminas foi feito colocando-se uma ponta de raiz na lâmina e sobre ela uma gota de carmim acético a 1%. A raiz foi esmagada primeiramente com uma espátula de ferro; em seguida foi colocada a lamínula sobre o material e aquecida levemente na chama. O excesso de corante que fluiu sob a lamínula foi retirado com papel de filtro, ao mesmo tempo esmagando-se fortemente o material até ficar reduzido a uma só camada de células.

Foram preparadas lâminas com raízes que pertenciam a sementes de dez plantas diferentes. As lâminas que apresentaram condições satisfatórias de observação microscópica, foram transformadas em permanentes.

As lâminas permanentes foram observadas ao microscópio para a determinação do número cromossômico, sendo que a maioria das células observadas das dez plantas tinham 40 cromossomos.

Não foram anotados dados sobre o número cromossômico

observado, pois esta parte da pesquisa só foi feita para ilustrar melhor, através de fotografias, os cromossomos mitóticos do material autotetraplóide analisado.

As fotografias foram tiradas com fotomicroscópio Zeiss, no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética da ESALQ. A objetiva utilizada foi 40X.

4.2.2 - Observações de campo e coleta de dados

4.2.2.1 - Cruzamento e autofecundação

Do dia 03 ao dia 12 de janeiro de 1979 foi selecionada em cada família, uma média de dez plantas mais vigorosas e realizaram-se cinco "SIBS", isto é, cruzamento entre plantas irmãs, e cinco autofecundações, sendo que a proteção dos pendões (inflorescências masculinas) e das barbas (inflorescências femininas) foram iniciadas no dia 02 de janeiro de 1979. A finalidade destes trabalhos era comparar as espigas obtidas por "SIB" e autofecundação com aquelas obtidas de polinização livre e ao mesmo tempo, conservar a pureza das sementes por meio de autofecundação.

As espigas foram coletadas nos dias 05 e 06 de março de 1979, e foram tiradas fotografias dos três grupos: "SIB", autofecundação e polinização livre.

Não foram coletados dados para serem processados estatisticamente, devido a que não é representativo comparar as espi-

gas obtidas por meio de trabalho manual, como é o caso de "SIB" e autofecundação, com espigas de polinização livre.

4.2.2.2 - Determinação de altura da planta, altura da primeira espiga e número de folhas por planta

Considerando que toda amostra deve ser representativa da população a que corresponde, foram selecionadas cinco plantas em cada família, que não estivessem nos extremos das fileiras ou isoladas dentro das fileiras. Isto, com a finalidade de que todas as plantas escolhidas estivessem na mesma situação de competição. Duas famílias não foram tomadas em conta devido ao baixo número de plantas por fileira.

As plantas assim selecionadas nas 22 famílias consideradas, foram submetidas à medição de altura da planta, altura da primeira espiga e número de folhas por planta, nos dias 22 e 23 de janeiro de 1979. Os dados de altura da planta e altura da primeira espiga foram expressos em centímetros.

4.2.2.3 - Determinação do número de sementes por espiga

O número de sementes por espiga foi determinado em quinze espigas de "SIB", quinze espigas de autofecundação e quinze espigas de fecundação livre, todas elas tomadas ao acaso, de quinze famílias que tinham espigas com os três tratamentos, com a finalidade

de de contar com uma referência do comportamento das plantas entre os três tratamentos mencionados.

Foram tomadas em conta somente as sementes boas viáveis, sendo eliminadas as que apresentavam defeitos.

Os dados foram ordenados de menor a maior número de sementes boas viáveis por espiga e foram calculados os valores médios das quinze espigas de cada tratamento.

4.2.3 - Análise estatística dos dados

4.2.3.1 - Análise para avaliar o número de cromossomos

A análise da variância para o número de cromossomos foi realizada com o objetivo de se comparar as famílias entre si e as plantas dentro das famílias, quanto às possíveis diferenças para esta característica.

Antes de se proceder à análise estatística foram tiradas as médias de grupos de cinco células dentro de cada planta. Deste modo cada planta passou a ser representada por quatro dados, correspondendo cada dado à média de cinco células. Com este procedimento objetivou-se tornar a distribuição dos dados com a forma normal, o que foi comprovado pelo teste do χ^2 (PIMENTEL GOMES, 1968). Em seguida foi realizada a análise da variância.

Considerou-se o seguinte modelo linear:

$$y_{ijk} = u + f_i + p_{j(i)} + d_{k(ij)},$$

onde: y_{ijk} : observação da célula $\underline{k}$, na planta $\underline{j}$, dentro da família

$\underline{i}$;

u : média geral;

f_i : efeito da família i ;

$p_{j(i)}$: efeito da planta $\underline{j}$, dentro da família i ;

$d_{k(ij)}$: efeito da célula $\underline{k}$, dentro da planta $\underline{j}$ e família $\underline{i}$.

De acordo com este modelo, o esquema da análise da variância é o seguinte:

F.V. ^{a/}	G.L.	Q.M.	F
Famílias (F)	$n-1$	Q_1	Q_1/Q_2
Plantas (P)/F	$\Sigma(k-1)$	Q_2	Q_2/Q_3
Células (C)/P/F	$\Sigma k(c-1)$	Q_3	
Total	$(c\Sigma k)-1$		

^{a/} O significado da simbologia encontra-se no Apêndice 1.

4.2.3.2 - Análise da variância das variâncias do número de cromossomos

A análise da variância das variâncias do número de cromossomos por planta, foi realizada com o objetivo de se comprovar se realmente a variação do número de cromossomos entre células dentro de uma mesma planta, era devido somente a efeitos ambientais.

Antes de se proceder a esta análise, os dados das variâncias dentro de planta foram transformados logaritmicamente na forma $\log_{10} s^2$, onde s^2 é a variância dentro de plantas. Em seguida foi realizada a análise da variância que obedeceu ao seguinte esquema:

F.V. ^{a/}	G.L.	Q.M.	F
Famílias (F)	n-1	Q ₁	Q ₁ /Q ₂
Plantas (P)/F	$\Sigma(k-1)$	Q ₂	
Total	$(\Sigma k)-1$		

a/ O significado da simbologia encontra-se no Apêndice 1.

4.2.3.3 - Análise da variância dos caracteres agronômicos estudados

Antes de se proceder à análise da variância dos caracteres agrônômicos (altura de planta, altura da primeira espiga e número de folhas por planta), os dados de número de folhas por planta foram transformados em $\sqrt{X}$. Em seguida foi realizada a análise da variância que obedeceu ao seguinte esquema.

F.V. ^{a/}	G.L.	Q.M.	F
Famílias (F)	n-1	Q ₁	Q ₁ /Q ₂
Plantas (P)/F	$\Sigma(k-1)$	Q ₂	
Total	$(\Sigma k)-1$		

a/ O significado da simbologia encontra-se no Apêndice 1.

5. RESULTADOS

5.1 - Variação Numérica de Cromossomos

5.1.1 - Contagem de cromossomos

A contagem do número de cromossomos nos microsporócitos mostrou que 60,56% das células estudadas tinham 40 cromossomos, sendo que as restantes 39,44% tinham 36 a 42, conforme está ilustrado na Tabela 3. Resultados similares encontram-se na Tabela 4, obtidos por outros pesquisadores.

Houve certas dificuldades na determinação exata do número de cromossomos nos microsporócitos porque não foi possível, em muitos casos, distinguir nitidamente o emparelhamento dos cromossomos. Comparando-se diversas células de uma mesma planta, verificou-se que ocorria variação no número de cromossomos nos microsporócitos, o que é impossível, pois todas essas células provêm de uma

única célula original por mitoses, e todas devem ter obrigatoriamente o mesmo número de cromossomos.

Tabela 3 - Variação numérica de cromossomos, baseada nas observações microscópicas de células de microsporócitos de milho autotetraplóide ($4n = 40$). Piracicaba, 1979.

	Nº de cromossomos							Total
	36	37	38	39	40	41	42	
Nº de plantas	1	1	10	8	43	6	2	71
% de plantas	1,41	1,41	14,09	11,27	60,56	8,45	2,81	100

Tabela 4 - Variação numérica de cromossomos, baseada nas observações microscópicas de células de microsporócitos de milho autotetraplóide ($4n = 40$). (SHAVER, 1960, p. 60).

	Nº de cromossomos								Total
	36	37	38	39	40	41	42	43	
Nº de plantas ^{a/}	7	6	73	108	506	146	30	6	882
% de plantas	0,8	0,7	8,3	12,2	57,4	16,5	3,4	0,7	100

^{a/} O número de plantas representa o total das observações realizadas por RANDOLPH (1935), KADAM (1948), CATCHESIDE (1956) e SHAVER (1960).

A análise da variância das variâncias do número de cromossomos transformado em $\log_{10} s^2$, deu um resultado não significativo, como pode ser observado na Tabela 5, o que indica que as diferenças no número de cromossomos entre células dentro de uma mesma planta são somente ambientais, ou seja, ocorreram erros de contagem.

As Figuras 2, 3 e 4 correspondem a células em diacinese tardia de uma mesma planta com 40 cromossomos, onde pode ser notada a dificuldade para se determinar exatamente o número de cromossomos por célula. A Figura 5 corresponde a uma célula somática da ponta da raiz com 40 cromossomos, proveniente de sementes remanescentes das plantas analisadas.

O resultado da análise da variância do número de cromossomos por família e por planta dentro de famílias, foi significativo a 5% de probabilidade a nível de famílias e a 1% de probabilidade a nível de plantas, conforme é mostrado na Tabela 6. Esse resultado indica que existem diferenças significativas e altamente significativas no número de cromossomos entre famílias e entre plantas, respectivamente. A média do número de cromossomos nas 71 plantas estudadas no presente trabalho foi de 39,37 e o C.V. foi de 1,08%.

5.1.2 - Associações cromossômicas

Na maioria dos microsporócitos observados predominava o emparelhamento de cromossomos na forma de bivalentes e tetravalentes, notando-se raramente a presença de univalentes. Trivalen-

tes não foram observados.

Cromossomos retardatários na anáfase I evidenciaram a existência de univalentes, fato ilustrado na Figura 6. Estas observações indicaram que há uma distribuição irregular dos cromossomos na meiose do milho tetraplóide.

Nas 1.420 células em diacinese observadas, 64,85% dos cromossomos estavam associados formando tetravalentes, 34,51% formando bivalentes e 0,64% formando univalentes (Tabelas 7, 8, 9 e 10).

Esses resultados indicam que aproximadamente 2/3 dos cromossomos do milho autotetraplóide estavam associados na forma de tetravalentes nos microsporócitos, sendo que os bivalentes correspondiam aproximadamente ao 1/3 restante dos emparelhamentos cromossômicos meióticos desse material.

5.2 - Caracteres Agronômicos

5.2.1 - Altura da planta

A altura média das plantas nas 24 famílias de milho autotetraplóide estudadas foi de 1,18 m, considerada de porte baixo. No entanto, as plantas apresentaram um desenvolvimento relativamente vigoroso.

A Tabela 11 mostra resultados que indicam uma não-significância, pela análise da variância para altura da planta; isso indica que não existe diferenças para este caráter na população es-

tudada. O C.V. foi de 13,6%.

5.2.2 - Altura da primeira espiga

O resultado médio para altura da primeira espiga foi de 0,52 m, sendo que a análise da variância foi significativa a 1% de probabilidade, conforme está indicado na Tabela 12. Isto indica que o caráter estudado se manifesta diferentemente entre as famílias de milho autotetraplóide estudadas. O C.V. foi de 16,0%.

5.2.3 - Número de folhas por planta

Os milhos tetraplóides estudados apresentaram em média 9,27 folhas por planta, sendo que a análise da variância foi significativa a 1% de probabilidade, conforme está indicado na Tabela 13, indicando que o caráter se manifesta diferentemente entre as famílias. O C.V. foi de 6,6%.

5.2.4 - Número de sementes por espiga

O número de sementes viáveis por espiga oscilou de 6 a 321, de 7 a 292 e de 51 a 234 para autofecundação, "SIB" e polinização livre, respectivamente. Esses resultados estão ilustrados na Tabela 14 e na Figura 7. Nas espigas tetraplóides observaram-se frequentemente grãos inviáveis, vazios e defeituosos, que provavelmente originam-se de gametas estéreis que apresentam aneuploidia. As Figuras 8, 9 e 10 ilustram os tipos de espigas autofecundadas, polinização livre e "SIB", respectivamente.

Figura 2 - Diacinese em microsporócitos de milho autotetraplóide, de ($4n = 40$) mostrando 1 VIII, 7 IV e 2 II. Escala: 5μ . Piracicaba, 1979.

Esquema interpretativo da Figura 2.
Escala: 5μ .

Figura 3 - Diacinese em microsporócitos de milho autotetraplóide ($4n = 40$) mostrando 8 IV e 4 II. Escala: 5μ . Piracicaba, 1979.

Esquema interpretativo da Figura 3.
Escala: 5μ .

Figura 4 - Diacinese em microsporócitos de milho autotetraplóide de ($4n = 40$) mostrando 7 IV e 6 II. Escala: 5μ . Piracicaba, 1979.

Esquema interpretativo da Figura 4.
Escala: 5μ .

Figura 5 - Metáfase em célula somática de raiz de milho autotetraplóide ($4n = 40$) mostrando 40 cromossomos. Escala: 5μ . Piracicaba, 1979.

Figura 6 - Anáfase I em microsporócitos de milho autotetraplóide mostrando cromossomos retardatários. Escala: 5μ Piracicaba, 1979.

Figura 7 - Número de sementes viáveis por espiga provenientes de autofecundação, "SIB" e polinização livre (15 espigas por tratamento) em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979.

Figura 8 - Espigas provenientes de autofecundação em milho autotetraplóide. Escala em cm. Piracicaba, 1979.

Figura 9 - Espigas provenientes de polinização livre em milho autotetraplóide. Escala em cm. Piracicaba, 1979.

Figura 10 - Espigas provenientes de "SIB" em milho autotetraplóide. Escala em cm. Piracicaba, 1979.

6. DISCUSSÃO

6.1 - Variação Numérica de Cromossomos

Alguns trabalhos da literatura mostram que os euplóides com 40 cromossomos em milho autotetraplóide, se mantêm constantes dentro de uma média de 60% (RANDOLPH, 1935; KADAM, 1948; CATCHESIDE, 1956 e SHAVER, 1960) e foi confirmado também no presente trabalho. Esse fato pode ser explicado pelo emparelhamento ao acaso dos quatro cromossomos homólogos (SYBENGA, 1972) e pela maior frequência de configurações em anel, com segregação alternada na anáfase (SYBENGA, 1975).

As mesmas explicações caberiam para as proporções de $2/3$ de quadrivalentes para $1/3$ de bivalentes encontradas por KADAM (1948) em três populações de milho autotetraplóide, por MORRISON e RAJHATHY (1960) em sete espécies de cereais e gramíneas autotetraplóides e obtidas também no presente trabalho.

Os aneuplóides representam, em média, 40% da população de milho autotetraplóide, com número de cromossomos oscilando de 36 a 43 segundo SHAVER (1960) e confirmado no presente trabalho com a obtenção de 39,44% de aneuplóides apresentando 36 a 42 cromossomos.

SHAYER (1961) considera que pode ser esperada uma relação positiva entre esterilidade de uma planta de milho autotetraplóide e seu grau de aneuploidia, sendo que a associação quadrivalente dos cromossomos é a causa principal da segregação irregular que pode ocorrer na anáfase I e resultar em gametas aneuplóides.

A este respeito, é interessante mencionar o trabalho de GILLES e RANDOLPH (1951) com milho autotetraplóide. Eles observaram um decréscimo na média de 8,47 para 7,46 quadrivalentes por célula depois de dez gerações de seleção para fertilidade.

A possibilidade de que multivalentes em milho autotetraplóide podem gradualmente ser substituídos por sinapses bivalentes regulares, que é característica dos organismos diplóides e alopoliplóides altamente férteis, é muito importante do ponto de vista do melhoramento.

No entanto, alguns autores como RANDOLPH (1935) e MORRISON e RAJHATHY (1960) não concordam que ocorre uma tendência para a bivalência em autotetraplóides.

A outra causa da segregação irregular dos cromossomos na anáfase I, é a redução da frequência de quiasmas que conduz

a uma alta frequência de univalentes, resultando na formação de gametas aneuplóides.

O estudo de SNOPE (1967) sobre o comportamento meiótico de milho autotetraplóide com cromossomo 10 anormal (K10), que apresenta cromatina adicional, demonstrou que a presença do K10 influi no aumento do número de quiasmas. No entanto, RHOADES (1942), KIKUOOME (1959) e RHOADES e DEMPSEY (1966a) afirmam que a presença do K10 produz segregação preferencial durante a megasporogênese.

Segundo RHOADES (1942), pólen K10 somente em parte tem sucesso em competir com pólen que possui cromossomo 10 normal, sugerindo que a cromatina extra presente no cromossomo anormal produz um efeito deletério no crescimento do tubo polínico.

Se bem que a frequência de quiasmas é muito importante para a fertilidade no milho autotetraplóide, e a presença do K10 influencia no aumento do número de quiasmas, foi visto que não pode ser empregado com esta finalidade devido aos efeitos deletérios que ele apresenta.

Considerando que o milho autotetraplóide pode se tornar economicamente importante, aumentando sua fertilidade através da "diploidização", o trabalho de SEMENOV *et alii* (1973a; 1973b) ocupa um lugar de destaque a este respeito. Estes autores conseguiram plantas com 16 a 18 bivalentes por célula irradiando sementes de milho autotetraplóide com raios-X e γ .

ENKEN (1973) menciona que híbridos simples e duplos

entre milhos tetraplóides irradiados e não irradiados mostraram heterose para fertilidade.

PARI (1978) obteve tetraplóides estáveis de milho, com menor período de crescimento e maior produção que os parentais, por duplicação do número de cromossomos de híbridos produzidos por cruzamento entre formas de diferentes altura e período de crescimento.

Esses trabalhos todos mostram que a exploração de milhos autotetraplóides é muito intensa e as pesquisas avançam na esperança de se obter tipos desejáveis.

Seria muito interessante prosseguir os estudos com os materiais disponíveis no Departamento de Genética da ESALQ e, em colaboração com o Centro de Energia Nuclear para a Agricultura (CENA), tentar conseguir plantas de milho autotetraplóide com 20 bivalentes, fato que iria garantir muito o sucesso destes materiais num programa de melhoramento.

6.2 - Caracteres Agronômicos

A literatura menciona que o milho autotetraplóide lembra o diplóide quanto à altura e hábitos de crescimento, mas tem folhas e pendões maiores, caules mais fortes e espigas e grãos de tamanho aumentado, se bem que as espigas geralmente não são bem grana das (RANDOLPH, 1935 e RHOADES, 1955).

SHAVER (1960) demonstrou que descendências de milho

autotetraplóide cruzadas ao acaso, isto é, plantas euplóides cruzadas com aneuplóides, muito se aproximam a populações de potencial agronômico.

Estudos realizados por GILLES e RANDOLPH (1951) com populações de milho autotetraplóide durante 10 gerações, onde o cruzamento natural ocorria em lotes isolados com 5 mil a 15 mil plantas, mostraram resultados que evidenciam a potencialidade do material.

No entanto, foi observado no presente trabalho, que a altura atingida pelas plantas autotetraplóides, como também o tamanho da espiga e dos grãos, era menor que os milhos brasileiros diplóides cultivados no Instituto de Genética em Piracicaba.

PATERNIANI (1973) indica alturas médias de 2,70 m e 1,70 m para cultivares de porte normal e porte anão, respectivamente, desenvolvidos na ESALQ, enquanto que os milhos autotetraplóides relatados no presente trabalho têm 1,18 m de altura. Deve-se lembrar que esse material poliplóide origina-se de linhagem norte-americana, fato que pode ser a explicação para sua pequena altura.

Sugere-se também que a menor altura de plantas e menor tamanho de espigas e grãos, discordantes com a literatura, poderia ser devido a efeitos ambientais, particularmente neste caso, excessivas observações realizadas na parcela que obrigou a constantes passagens entre as linhas com o pisoteio do solo e manuseamento permanente das plantas que impediram o normal desenvolvimento das mesmas.

Nas espigas tetraplóides observaram-se frequentemente grãos inviáveis, vazios e defeituosos, que provavelmente originam-se de gametas estéreis aneuplóides, sendo que o número de sementes viáveis por espiga atingiu até um máximo de 321.

Os resultados obtidos por LEVINGS *et alii* (1967) para peso da espiga em linhagens e híbridos, são comparáveis com os resultados de número de sementes por espiga obtidos neste trabalho. Eles observaram que o aumento de autofecundação resultava num decréscimo significativo no peso da espiga e outros caracteres (Tabela 2), sendo que os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o número de sementes por espiga autofecundada foi menor que aquele obtido de polinização livre.

A este respeito é importante mencionar o trabalho de MÜNTZING e AKDIK (1948) que, analisando os distúrbios citológicos na primeira geração de autofecundação em centeio, planta alógama como o milho, encontraram correlações positivas entre emparelhamento cromossômico, fertilidade e vigor. Os autores sugeriram que a segregação dos genes responsáveis pelas irregularidades meióticas fosse responsável pela degeneração do organismo autofecundado. Estas irregularidades levariam à esterilidade e contribuiriam para a extinção de algumas linhagens. Além das irregularidades meióticas ocasionadas pela autofecundação em alógamas, provavelmente as plantas homozigotas recessivas para o gene *elongate*, que produzem óvulos não reduzidos, contribuem na formação de gametas inviáveis.

6.3 - Comportamento Meiótico

6.3.1 - Nucléolos

No paquíteno observou-se sempre um único nucléolo, enquanto que nas diadas foram encontrados frequentemente dois nucléolos em cada núcleo, fato já descrito por RHOADES e DEMPSEY (1966b). As diadas com dois nucléolos por núcleo originam tétradas cujos núcleos também têm dois nucléolos cada, indicando a presença de dois cromossomos 6 de milho.

Observaram-se também tétradas com duas de suas células binucleoladas e duas células uninucleoladas (Figura 11), sendo originadas possivelmente de um microsporócito aneuplóide onde estava faltando um cromossomo 6.

O fato de que no paquíteno não se observam nunca dois nucléolos, leva a concluir que eles estão fundidos nesta fase.

Em séries poliplóides o número de nucléolos presente pode ser útil como indicador do nível de ploidia envolvido. Contudo, deve-se tomar cuidado ao se usar o número de nucléolos como indicador do nível de ploidia porque ele é um composto estrutural e está sujeito a quebra e translocações.

6.3.2 - Ocorrência de univalentes

Se bem que nos microsporócitos na fase de diacinese foram raramente notados os univalentes, eles eram observados fre-

Figura 11 - Tétrada em microsporócitos de milho autotetraplóide mostrando duas das células filhas com 2 nucléolos e as outras duas com 1 nucléolo. Escala: 40μ . Piracicaba, 1979.

quentemente na anáfase I, aparecendo como cromossomos retardatários (Figura 6). Trabalhos mais antigos (RANDOLPH, 1335) e outros mencionados na literatura, chegando até DAS (1970) e SEMENOVA *et alii* (1971), mencionam a presença de univalentes na anáfase I.

O fato de eles não se observarem com frequência na metáfase e na diacinese, se deve a que a maioria dos cromossomos homólogos estão associados, formando bivalentes, quadrivalentes e, às vezes, até octovalentes, conforme as Figuras 2, 3 e 4.

É interessante considerar que nas plantas diplóides, na fase de metáfase e diacinese, a ocorrência de pares de univalentes é frequente, observando-se que em plantas autofecundadas, linhagens e gerações F_2 , o número de plantas com pares de univalentes é maior que em híbridos, segundo PAGLIARINI (1980). Neste trabalho mostra-se que a presença de pares de univalentes está correlacionada com a frequência de quiasmas, sendo que a redução desta aumenta a presença de pares de univalentes e, conseqüentemente, aumenta a esterilidade.

A presença de univalentes em milho autotetraplóide conduz à formação de gametas aneuplóides inviáveis, resultando em aborto de pólen e conseqüentemente afetando a fertilidade do material.

Desta forma, pesquisas com populações originais de milho autotetraplóide, visando a "diploidização" do material, poderiam ser de grande valor no intento de aumentar a fertilidade.

6.4 - Métodos de Indução

Mesmo que nas culturas econômicas, a poliploidia não tenha alcançado o sucesso obtido em floricultura e fruticultura, on de a exploração de poliplóides é muito intensa, as pesquisas avançam na esperança de se obter os mesmos resultados. Um impedimento pa ra se usar em larga escala essa técnica em programas de melhoramento de milho, tem sido a dificuldade da indução de autotetraplóides.

Conforme a literatura, existem métodos de indução com alta temperatura, emprego de colchicina, genes maiores e, mais recentemente, a cultura de tecidos.

O emprego de alta temperatura (RANDOLPH, 1932) foi eficiente, mas, provavelmente não é muito utilizado por causa de efeitos negativos que possa ter sobre a formação de espigas devido à alteração de proteínas e outras substâncias, bem como por não ser um método muito prático.

A colchicina não foi eficiente na indução de poliplóides em milho (RHOADES, 1955; PATERNIANI e DIMARZIO, 1967) pelos resultados negativos obtidos, além de ser uma substância de elevado custo, o que reduz a utilização deste método.

Embora o método de ALEXANDER (1957) de indução de te traplóides com o emprego do gene *el* (elongate) seja eficiente, o ad vento da técnica de cultura de tecidos, na obtenção de diferentes níveis de ploidias foi muito facilitada (DHALIWAL e KING, 1979).

A cultura de tecidos é um método mais direto e mais seguro na indução de poliplóides, mesmo que se considerem os problemas de técnica ainda encontrados pelos que manipulam células ou tecidos *in vitro*.

A obtenção de milho autotetraplóide, de grande utilidade para o geneticista, deixou de ser um entrave nos programas de melhoramento, com as novas técnicas que facilitam esse processo.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas análises do número de cromossomos por planta e dos caracteres agronômicos, nas famílias de milho autotetraplóide estudadas, permitiram as seguintes conclusões:

1) O número de plantas euplóides com 40 cromossomos se mantém dentro de uma média de 60% dos indivíduos da população, sendo que os aneuplóides apresentam de 36 a 42 cromossomos, dentro de uma média de 40% da população.

2) As diferenças estatísticas observadas entre famílias e entre plantas para o número de cromossomos, refletem a presença de aneuplóides na população de milho autotetraplóide, fato que reduz a fertilidade pelo aborto de pólen, ocasionado pela ocorrência de univalentes, na formação de gametas não balanceados.

3) A presença frequente de sementes inviáveis, vazias e defeituosas nas espigas é indicadora da ocorrência de gametas aneuplóides inviáveis.

4) O número de sementes viáveis por espiga foi menor nas plantas autofecundadas que nas de polinização livre, indicando que a autofecundação influencia negativamente a fertilidade dos milhos autotetraplóides. Para isto, além das irregularidades meióticas ocasionadas pela autofecundação em alógamas, provavelmente as plantas homozigotas para o gene *elongate* que produzem óvulos não reduzidos, contribuem na formação de gametas inviáveis.

5) Os caracteres agronômicos, como altura de planta, considerada de porte baixo (1,18 m), comprimento da espiga e tamanho das sementes, relativamente reduzidos, sugere que provavelmente a origem genética norte-americana do material e interações genético-ambientais tenham influenciado o desenvolvimento das plantas.

6) No paquíteno observou-se sempre um único nucléolo, enquanto que nas diadas foram encontrados frequentemente dois nucléolos em cada núcleo, indicando a presença de dois cromossomos 6 de milho. Observaram-se também tétradas com duas de suas células binucleoladas e duas células uninucleoladas, sendo originadas possivelmente de um microsporócito aneuplóide, onde estava faltando um cromossomo 6. O fato de que no paquíteno não se observaram nunca dois nucléolos, leva a concluir que eles estão fundidos nesta fase.

7) Os univalentes foram raramente notados na fase de diacinese, mas eles eram observados frequentemente na anáfase I, aparecendo como cromossomos retardatários. Este fato demonstra que na diacinese a maioria dos cromossomos homólogos estão associados, formando multivalentes, e que na anáfase I ocorre uma segregação irregular dos cromossomos.

8) Aproximadamente 2/3 dos cromossomos do milho autotetraplóide estavam associados na forma de tetravalentes, sendo que os bivalentes correspondiam aproximadamente ao 1/3 restante dos emparelhamentos cromossômicos meióticos desse material. Essa alta frequência de quadrivalentes, com segregação irregular na anáfase I, também contribui na diminuição da fertilidade do milho autotetraplóide.

9) A indução de "diploidização" de material tetraplóide, através da irradiação, poderia abrir novas perspectivas para o uso do milho autotetraplóide em programas de melhoramento.

10) A obtenção de milho autotetraplóide, de grande utilidade para o geneticista, deixou de ser um entrave nos programas de melhoramento, com as novas técnicas que facilitam esse processo.

8. SUMMARY

The chromosome counting of the autotetraploid corn microsporocytes was carried out in 71 plants in a total amount of 1,420 cells in the late diacinese phase. The result showed that 60.56% of the studied cells had 40 chromosomes; it was shown that the chromosome number varied from 36 to 42 per cell.

In most of the observed microsporocytes predominated the pairing in the form of bivalents and tetravalents, seldom appearing univalents. Trivalents were not found. Straggling chromosomes in the anaphase I demonstrated the existence of univalent ones. These observation showed that there is an irregular chromosome distribution in the autotetraploid corn meiosis for the daughter cells.

From the total of observed cells, 64.85% of the chromosomes were associated, forming tetravalents, 34.51% forming biva-

lents and 0.64% forming univalents. It was observed that nearly $2/3$ of the autotetraploid corn chromosomes were associated, forming tetravalents in the microsporocytes, the bivalents being nearly the remaining $1/3$ of the meiotic chromosomal pairing of this material.

The ring shaping or chain shaping were often observed in autotetraploid corn meiosis studied, but other shapes were observed as well. The greater frequency of ring-shaping with alternated segregation in the anaphase observed in the autotetraploid corn, explains the average of 60% euploids with 40 chromosomes carried out in several researches by many authors.

In the pachytene only one nucleolus was observed while in the diads were often found two nucleolus in each nucleus, indicating the presence of two chromosomes 6 of corn. Also were observed tetrads having two binucleolated cells and two uninucleolated cells which probably came from an aneuploid microsporocyte where one chromosomal 6 was missing. The fact that two nucleolus were never observed in the pachytene leads us to think are joined in the phase.

The 24 autotetraploid corn families studied showed plants with a relatively vigorous development, but with medium height of 1.18 m, considered as of short size. The average height of the first ear was 0.52 m. The average number of leaves per plant was 9.27. The ears were also of small size, being the self-fertilizing, "sibs" and the free pollinization, yielded in average 105, 116 and

137 viable seeds per ear respectively. In these autotetraploid ears inviable grains were observed, originated from aneuploid sterile gametes, the amount of viable seeds per ear attained the maximum number of 321.

The decreased fertility observed in the studied autotetraploid corn colony in this work and also observed by various researches is the inevitable consequence of the irregular segregation of the chromosomes in anaphase I, which forms unbalanced gametes producing consequently the pollen abortion.

The "diploidization" induction, or the 20 bivalent production from the autotetraploid material through irradiation, is an open field for research with new perspectives for the use of autotetraploid corn in improvement programs.

9. RÉSUMÉ

Le compte de número de chromosomes dans les microsporocytes du maïs autotetraploïde, a été réalisé avec 71 plantes, dans un total de 1.420 cellules dans la phase de diacinese tardive. Les résultats ont démontrés que 60,56% des cellules étudié avaient 40 chromosomes; on a vérifié que le nombre de chromosomes par cellule variait de 36 à 42.

Dans la majorité des microsporocytes observés prédominaient les couples de chromosomes dans la forme de bivalents et tetravalents; la présence d'univalents a été rarement remarqué. On n'a pas remarqué la présence de trivalents. Des chromosomes retardataires dans l'anaphase I ont démontrés l'existence des univalents.

Ces observations ont indiqués qu'il y a une distribution irrégulière de chromosomes dans la meiose de maïs autotetra-

ploïde pour les cellules filles.

Du total de cellules observés, 64,85% des chromosomes étaient associés formant des tétravalents, 34,51% formant des bivalents et 0,64% formant des univalents. On observe que presque $2/3$ des chromosomes du maïs autotetraploïde étaient associés formant des tétravalents dans les microsporocytes, ainsi que les bivalentes correspondent presque au $1/3$ que reste des couples chromosomiques meiotiques de ce matériel.

Des configurations en anneau ou en chaîne ont été observées souvent dans la méiose de maïs autotetraploïdes étudié, mais aussi des autres configurations ont été détectées. La plupart des configurations en anneau, avec ségrégation alternée dans l'anaphase, observé dans les maïs autotetraploïdes, explique pourquoi on a obtenu en moyenne 60% d'euploïdes avec 40 chromosomes dans plusieurs recherches de beaucoup des auteurs.

On a observé toujours dans le pachytène un seul nucléole, pendant que dans les diades on a souvent trouvé deux nucléoles dans chaque nucleus, indiquant la présence de deux chromosomes 6 de maïs. On a observé aussi des tétrades avec deux de ces cellules binucléolés et deux cellules uninucléolés, provenant probablement d'un microsporocyte aneuploïde où manquait un chromosome 6. Le fait que dans le pachytène on n'a jamais observé deux nucléoles nous portant à la conclusion qu'il sont ensemble dans cette phase.

Les 24 familles de maïs autotetraploïdes étudié ont

montrés des plantes avec un développement plutôt vigoureux, mais avec une hauteur moyenne de 1,18 m, considéré comme basse. L'hauteur moyenne de la première épi a été de 0,52 m. La moyenne des feuilles par plante a été 9,27. Les épis étaient petites, les auto-fecondés, "sibs" et de polinization libre ont produits, en moyenne, 105, 116 et 137 des grains viables par épi, respectivement. Dans ces épis autotetraploïdes on a souvent observé des grains pas viables, vides ou avec des défauts, probablement originés de gametes stériles aneuploïdes, les nombres des sémences viables par épi arrivait au maximum de 321.

La réduction de la fertilité observé dans les populations de maïs autotetraploïdes étudié dans ce travail, et aussi observé par plusieurs chercheurs, est la conséquence inévitable de la ségrégation irrégulière des chromosomes dans l'anaphase I, formant des gametes pas balancés, produisant par conséquence l'avortement du pollen.

L'induction de la "diploidization", c'est à dire, la production de 20 bivalents du matériel autotetraploïde avec l'irradiation, c'est un champ ouvert pour la recherche, avec des nouvelles perspectives pour l'utilisation du maïs autotetraploïde dans les programmes des améliorations.

10. LITERATURA CITADA

ALEXANDER, D.E., 1957. The genetic induction of autotetraploidy: a proposal for its use in corn breeding. Agron. J., 49: 40-43.

ALEXANDER, D.E. e J.B. BECKETT, 1963. Spontaneous triploidy and tetraploidy in maize. J. Heredity, 54: 103-106.

ALLARD, R.W., 1967. Principios de la Mejora Genética de las Plantas. MONTOYA, J.L., Trad. Barcelona, Editora Omega. 498 p.

BINGHAN, E.T., 1965. Bivalent pairing in autotetraploids. Maize Genet. Coop. News Letter, 39: 132-134.

CARLSON, W.R., 1977. The cytogenetics of corn. In: SPRAGUE, G.F., Ed. Corn and Corn Improvement. New York, Academic Press, p. 225-293. (Agronomy, 18).

CATCHESIDE, D.G., 1956. Double reduction and numerical non-disjunction in maize. Heredity, 10: 205-218.

- CHASE, S.S., 1969. Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). Bot. Rev., 35: 117-167.
- CROCOMO, O.J., 1978. Cultura de células e tecidos: potencial para o melhoramento de plantas. Anais do simpósio sobre culturas de células. ACIESP, 10: 217-227.
- DAS, L.V.D., 1970. Chromosome associations in diploid and autotetraploid *Zea mays* Linn. Cytologia, 35: 259-261.
- DHALIWAL, H.S. e P.J. KING, 1979. Ploidy analysis of haploid-derived tissue cultures of *Zea mays* by chromocentre counting. Maydica, 24: 103-112.
- ENKEN, V.B., 1973. Materials on the genetics and methodology of plant breeding. Problem. teor. i prikl. genet. Novo sibirsk, USSR, p. 160-177. Apud Plant Breed. Abst., Cambridge, 47(3): 2066, 1977. (Resumo).
- GILLES, A. e L.F. RANDOLPH, 1951. Reduction of quadrivalent frequency in autotetraploid maize during a period of 10 years. Am. J. Bot., 38: 12-17.
- GOTTSCHALK, W., 1976. Die Bedeutung der Polyploidie für die Evolution der Pflanzen. (A Importância da Poliploidia para a Evolução das Plantas). Fisher Verlag, Stuttgart, Alemanha, 5011. 500 p.
- GRANT, V., 1963. The origin of adaptations. Columbia University Press, New York, 606 p.
- HANDRO, W., 1978. Aspectos comparados da fisiologia de células e tecidos vegetais haplóides e diplóides cultivadas *in vitro*. Anais do simpósio sobre culturas de células. ACIESP, 10: 193-199.

- JACKSON, R.C., 1976. Evolution and systematic significance of polyploidy. Am. Rev. Ecol. Syst., 7: 209-234.
- KADAM, B.S., 1948. Chromosome studies in relation to fertility and vigour in inbred and open-pollinated strains of autotetraploid maize. I. Behavior of 40-chromosome plants. Indian J. Genetics and Plant Breeding, 4: 8-22.
- KATO Y., T.A., 1975. Cytological studies of maize (*Zea mays* L.) and teosinte (*Zea mexicana* Schades Kuntze) in relation to their origem and evolution. Massachusetts and Amherst. 185 p. (Bulletin, 635).
- KERMICLE, J.L., 1969. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. Science, 166: 1422-1424.
- KERMICLE, J.L., 1971. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize. Am. J. Bot., 58: 1-7.
- KIKUDOME, G.Y., 1959. Studies on the phenomenon of preferential segregation in maize. Genetics, 44: 815-831.
- LEVINGS, C.S.; J.W. DUDLEY e D.E. ALEXANDER, 1967. Inbreeding and crossing in autotetraploid maize. Crop Science, 7: 72-73.
- MORRISON, J.W. e T. RAJHATHY, 1960. Frequency of quadrivalents in autotetraploid plants. Nature, 187: 528-530.
- MÜNTZING, A. e S. AKIDIK, 1948. Cytological disturbances in the first inbred generations of rye. Hereditas, 34: 485-509.

- NEL, P.M., 1970. Evidence for an effect of the elongate gene on crossing-over in chromosome 5. Maize Genet. Coop. News Letter, 44: 61-65.
- PAGLIARINI, M.S., 1980. Controle genético da frequência de quiasmas em milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, ESALQ/USP, 113 p. (Dissertação de Mestrado).
- PARII, F.N., 1978. Polyploidy use in breeding corn. Institut Agromii, Kiev, 30. Apud Plant Breed. Abst., Cambridge, 48(12): 11492, 1978. (Resumo).
- PATERNIANI, E. e J.A. DIMARZIO, 1967. Relatório Científico. ESALQ/USP, SP, Brasil. 117 p.
- PATERNIANI, E., 1973. Relatório Científico. ESALQ/USP, SP, Brasil, 217 p.
- PIMENTEL GOMES, F., 1968. Iniciação à Estatística. 2a. Ed. SP, Brasil, Nobel. 205 p.
- PUNYASHING, K., 1947. Chromosome numbers in crosses of diploid, triploid and tetraploid maize. Genetics, 32: 541-554.
- RANDOLPH, L.F., 1932. Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. Proc. Nat. Acad. Sci., 18: 222-229.
- RANDOLPH, L.F., 1935. Cytogenetic of tetraploid maize. J. Agric. Res., 50: 591-605.
- RHOADES, M.M., 1936. Note on the origin of triploid in maize. J. Genet., 33: 355-357.

- RHOADES, M.M., 1942. Preferential segregation in maize. Genetics, 27: 395-407.
- RHOADES, M.M., 1955. The cytogenetics of maize. In: SPRAGUE, G.F., Ed. Corn and Corn Improvement. New York, Academic Press, p. 123-212. (Agronomy, 5).
- RHOADES, M.M. e E. DEMPSEY, 1966a. The effect of abnormal chromosome 10 on preferential segregation and crossing-over in maize. Genetics, 53: 989-1020.
- RHOADES, M.M. e E. DEMPSEY, 1966b. Induction of chromosome doubling at meiosis by the elongate gene in maize. Genetics, 54: 505-522.
- RHOADES, M.M. e H. VILKOMERSON, 1942. On the anaphase movement of chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci., 28: 433-436.
- SEMENOVA, E.V.; V.I. SEMENOV e L.F. KAPITSYNIA, 1971. Analysis of the causes and mechanisms of the decrease of fertility in autotetraploid maize. I. Meiosis in aneuploid plants. Genetika, Moskva 7(2): 5-19. Apud Plant Breed. Abst., Cambridge, 41(4): 7456, 1971. (Resumo).
- SEMENOV, V.I., E.V. SEMENOVA e L.F. KAPITSYNIA, 1973a. An increase in the frequency of bivalents in tetraploid maize as a result of work on experimental diploidization. Izv. Sib. otd AN SSSR serv. biol. n., 5, p. 66-71. Apud Plant Breed. Abst. Cambridge, 46(3): 2338, 1976. (Resumo).
- SEMENOV, V.I.; E.V. SEMENOVA e L.F. KAPITSYNIA, 1973b. Increase in the frequency of bivalents formation in tetraploid maize effected by irradiation, hybridization and selection. Itogi nouch.rabot.

- In-t tsitol. i genet. Sib. otd AN SSSR, Novosibersk, p. 54-55.
Apud Plant Breed. Abst., Cambridge, 47(5): 4185, 1977. (Resumo).
- SHAYER, D.L., 1960. Chromosome numbers in the progeny of randomly intercrossing tetraploid maize. Maize Genet. Coop. News Letter, 34: 60-61.
- SHAYER, D.L., 1961. The relationship of aneuploidy to sterility in tetraploid maize. Maize Genet. Coop. News Letters, 35: 2-5.
- SHAYER, D.L., 1962. A study of aneuploidy in autotetraploid maize. Can. J. Genet. Cytol., 4: 226-233.
- SNOPE, A.J., 1967. Meiotic behavior in autotetraploid maize with abnormal chromosome 10. J. Heredity, 58: 173-177.
- STEBBINS, G.L., Jr., 1949. Types of polyploids: their classification and significance. Adv. in Genet., 1: 403-430.
- SUMNYJ, V.K., 1964. Experimentally produced maize tetraploids. Proc. Acad. Sci., USSR, 154: 445-448. Apud Plant Breed. Abst., Cambridge, 34(3): 3998, 1964. (Resumo).
- SUMNYJ, V.K., 1965. A procedure for producing and selecting tetraploid forms of maize involving the application of colchicine. Ser. Biol. Med. Sci., USSR, 2: 19-23. Apud Plant Breed. Abst., Cambridge, 35(4): 6306, 1965. (Resumo).
- SYBENGA, J., 1972. General Cytogenetics. North-Holland Publishing Company. Amsterdam-London. American Clesevie. Publishing Co., Ind. New York. 359 p.

SYBENGA, J., 1975. Meiotic Configurations. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. New York. FRANKEL, R. Ed. 251 p.

THOMAS, E.; R. BRETTEL e W. WERNICKE, 1979. Corn anther cultura. Maize Genet. Coop. News Letter, 53: 15-16.

VENKATESWARLU, J., 1964. Pachytene pairing in auto-tetraploid maize. Maize Genet. Coop. News Letter, 38: 6-7.

WARFIELD, T.C., Jr., 1956. The relationship of pollen abortion and seed set in tetraploid maize. Maize Genet. Coop. News Letter, 30: 38.

APENDICE I

Significado da simbologia empregada nas análises da variância para avaliar o número de cromossomos e os caracteres agronômicos em milho autotetraplóide:

F.V.	: fonte de variação
G.L.	: número de graus de liberdade
S.Q.	: soma de quadrados
Q.M.	: quadrado médio
Famílias (F)	: entre famílias
Plantas (P)/F	: entre plantas dentro de famílias
Células (C)/P/F	: entre células dentro de plantas, dentro de famílias
n	: número de famílias
k	: número de plantas dentro de família
c	: número de células dentro de planta

Tabela 5 - Análise da variância das variâncias, transformadas em $\log_{10} s^2$, do número de cromossomos de cada planta, para as 24 famílias de milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979.

F.V. ^{a/}	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Famílias (F)	23	4,31263833	0,18750601	0,81ns
Plantas (P)/F	47	10,89759047	0,23186362	
Total	70	15,21022880		

n.s.: não significativo.

a/ O significado da simbologia encontra-se no Apêndice 1.

Tabela 6 - Análise da variância do número de cromossomos por família e por planta dentro de família em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979.

F.V. ^{a/}	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Famílias (F)	23	135,0639	5,8723	1,80*
Plantas (P)/F	47	152,9518	3,2543	17,99**
Células (C)/P/F	213	38,5301	0,1809	
Total	283	326,5458		

*: significativo a 5% de probabilidade.

** : significativo a 1% de probabilidade.

a/ O significado da simbologia encontra-se no Apêndice 1.

Tabela 7 - Frequência média de associação quadrivalente (IV), bivalente (II) e monovalente (I) por célula, número médio de cromossomos por célula para as três associações cromossômicas e porcentagem de associação cromossômica por célula em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979.

Associação cromossômica ^{a/}	Frequência média de associação cromossômica/célula	Nº médio de cromossomos/célula	% de associação cromossômica/célula
Quadrivalente (IV)	6,37	25,48	64,85
Bivalente (II)	6,78	13,56	34,51
Monovalente (I)	0,25	0,25	0,64
Total		39,29	100,00

a/ O número total de células correspondente a cada associação cromossômica, encontra-se nas Tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8 - Associação cromossômica quadrivalente (IV) na fase de diacinese tardia em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979.

Nº total de células	Nº de IV por célula	% de IV por célula	Nº total de IV	Nº médio de IV por célula
8	4	0,56	32	
173	5	12,18	865	
648	6	45,63	3.888	
483	7	34,01	3.381	
90	8	6,34	720	
16	9	1,13	144	
2	10	0,15	20	
1.420		100,00	9.050	6,37

Tabela 9 - Associação cromossômica bivalente (II) na fase de diacinese tardia em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979.

Nº total de células	Nº de II por célula	% de II por célula	Nº total de II	Nº médio de II por célula
2	0	0,14	0	
4	1	0,28	4	
13	2	0,91	26	
17	3	1,20	51	
82	4	5,77	328	
107	5	7,55	535	
396	6	27,89	2.376	
352	7	24,79	2.464	
270	8	19,01	2.160	
102	9	7,18	918	
68	10	4,79	680	
4	11	0,28	44	
3	12	0,21	36	
1.420		100,00	9.622	6,78

Tabela 10 - Associação cromossômica monovalente (I) na fase de diacinese tardia em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979.

Nº total de células	Nº de I por célula	% de I por célula	Nº total de I	Nº médio de I por célula
1.128	0	79,44	0	
243	1	17,11	243	
32	2	2,25	64	
17	3	1,20	51	
1.420		100,00	358	0,25

Tabela 11 - Análise da variância da altura das plantas em 22 famílias de milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979.

F.V. ^{a/}	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Famílias (F)	21	7872,6637	374,8887	1,44ns
Plantas (P)/F	88	22839,6000	259,5409	
Total	109	30712,2637		

ns: não significativo.

^{a/} O significado da simbologia encontra-se no Apêndice 1.

Tabela 12 - Análise da variância da altura da primeira espiga em 22 famílias de milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979.

F.V. ^{a/}	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Famílias (F)	21	4552,9445	216,8073	3,15**
Plantas (P)/F	88	6058,0100	68,8410	
Total	109	10610,9545		

** : significativo a 1% de probabilidade.

a/ O significado da simbologia encontra-se no Apêndice 1.

Tabela 13 - Análise da variância do número de folhas por planta, transformado em $\sqrt{X}$, em 22 famílias de milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979.

F.V. ^{a/}	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Famílias (F)	21	2,6066	0,1241	2,97**
Plantas (P)/F	88	3,6825	0,0418	
Total	109	6,2891		

** : significativo a 1% de probabilidade.

a/ O significado da simbologia encontra-se no Apêndice 1.

Tabela 14. - Número de sementes viáveis por espiga provenientes de autofecundação, "SIB" e polinização livre (15 espigas por tratamento) em milho autotetraplóide. Piracicaba, 1979.

Nº DE ESPIGA	Nº DE SEMENTES POR ESPIGA		
	Autofecundação	"SIB"	Polinização livre
1	6	7	51
2	11	20	59
3	12	27	64
4	18	35	74
5	22	55	88
6	50	58	103
7	59	63	109
8	59	95	127
9	80	96	132
10	100	165	172
11	164	167	198
12	202	200	205
13	210	213	214
14	265	245	220
15	321	292	234
Total	1.579	1.738	2.050
Média	105,3	115,9	136,7