

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**SELEÇÃO PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE GAMETAS NÃO
REDUZIDOS E POLIPLOIDIZAÇÃO SEXUAL EM TREVO VERMELHO
(*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)**

Carine Simioni
Bióloga, Mestre em Zootecnia

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em
Zootecnia
Área de Concentração Plantas Forrageiras

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2004

Esta tese é dedicada aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sérgio e Cirja, que sempre acreditaram, apoiaram e estiveram presentes nos piores e nos melhores momentos desta trajetória.

Aos meus irmãos, Mano e Mirca, meus cunhados João e Jaqueline, que colaboraram sempre, e meus sobrinhos, Igor, Tales e Tomás, que conseguiram me fazer rir e sorrir até nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Maria Teresa Schifino-Wittmann e ao professor Miguel Dall'Agnol, pela orientação, colaboração, compreensão e confiança.

Aos funcionários do Departamento, Rogério e Jamir, pela colaboração durante a realização do trabalho.

À minha bolsista Divanilde Guerra, que foi fundamental e indispensável para o andamento do experimento.

Às minhas colegas de laboratório, Elaine, Ionara, Paula, Fernanda, Mirela, Marisa, Tatiana, Fabiana, Doriane e Vanessa, que tiveram imensa paciência, pois foram companheiras, amigas, e colaboraram em várias etapas do trabalho.

Ao colega Daniel Montardo, pela colaboração e fundamental auxílio durante o andamento do trabalho.

E a todos aqueles, da Universidade ou não, que, de alguma forma, contribuíram para que esta tese fosse realizada.

SELEÇÃO PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE GAMETAS NÃO REDUZIDOS E POLIPLOIDIZAÇÃO SEXUAL EM TREVO VERMELHO (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)¹

Autora: Carine Simioni

Orientadora: Maria Teresa Schifino-Wittmann

RESUMO

Trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.), é uma leguminosa forrageira de excelente qualidade, mas não persistente no Rio Grande do Sul. Plantas com maior variabilidade genética podem tornar esta espécie mais estável e produtiva. Poliplóides sexuais ocorrem em populações naturais e apresentam uma ampla base genética. Os objetivos deste trabalho foram: no Experimento 1, obter plantas poliplóides sexuais através de cruzamentos unilaterais e verificar a fertilidade desta descendência. No Experimento 2, cruzamentos bilaterais visaram aumentar a produção de gametas não reduzidos ($2n$) em plantas diplóides em três ciclos de seleção. No Experimento 1, a geração parental foi composta por tetraplóides somáticos e plantas diplóides da cv. Quiñiqueli, selecionadas por produzirem de 1 até 9,07% de gametas $2n$. Em quatro gerações, a presença de indivíduos férteis triplóides indicou que estes podem ser utilizados como uma ponte para a produção de plantas tetraplóides. No Experimento 2, no primeiro ciclo, foram selecionadas plantas das cultivares Quiñiqueli, Redland e Keenland, que produziram no mínimo 1% de pólen gigante. No segundo e terceiro ciclos, plantas com no mínimo 2% e 3% de produção de pólen $2n$ foram selecionadas, respectivamente. A porcentagem de produção aumentou de 1,67% na população original para 8,97% na última geração de plantas selecionadas. O ganho de seleção foi de 437,12%, com diferencial de seleção de 7,3%. Os dados comprovaram que os métodos de detecção de grãos de gametas $2n$ e de seleção são eficientes, tornando possível obter plantas poliplóides sexuais em etapas avançadas, a partir de populações selecionadas de trevo vermelho.

¹Tese de Doutorado em Zootecnia – Plantas Forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (211p.). Fevereiro, 2004.

SELECTION FOR THE INCREASE OF UNREDUCED GAMETES
PRODUCTION AND SEXUAL POLYPLOIDIZATION IN RED CLOVER
(*TRIFOLIUM PRATENSE* L.)¹

Author: Carine Simioni

Adviser: Maria Teresa Schifino-Wittmann

ABSTRACT

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is a very good quality legume forage but not persistent in Rio Grande do Sul. Plants with higher genetic variability may increase the species' stability and productivity. Sexual polyploids may arise in natural populations, therefore broadening its genetic basis. The objectives of this work were to obtain sexual polyploids through unilateral crosses and to assess the progeny fertility in Experiment 1; and to increase the production of unreduced gametes (2n) in diploid plants during three selection cycles in Experiment 2. In the first experiment the progenitors were somatic tetraploids and diploid plants of cv. Quiñiqueli selected for producing from 1 up to 9,07% of 2n gametes. The presence of fertile triploids in four generations indicated that they can be used as a bridge to produce tetraploids. In the first selection cycle of the second experiment, plants of cultivars Quiñiqueli, Redland and Keenland, producing at least 1% of giant pollen grains were selected; in the second and third cycles, plants with at least 2% and 3% of 2n pollen were respectively selected. Percentage of 2n pollen production increased from 1.67% in the original populations to 8.97% in the last generation of selected plants. Selection gain was 437.12% with a selection differential of 7.3%. The results showed that the methods to detect 2n gametes and the selection employed were efficient, allowing the future obtention of sexual polyploids in advanced generations from red clover populations.

¹ Doctoral thesis in Forage Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (211p.). February, 2004.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O trevo vermelho.....	3
2.1.1. Origem e distribuição.....	3
2.1.2. Características morfológicas.....	4
2.1.3. Modo de reprodução.....	5
2.1.4. Utilização e importância.....	7
2.2. Genética, melhoramento e poliploidia.....	8
2.2.1. Poliploidia.....	9
2.2.1.1. Mecanismos de formação poliplóide.....	12
2.2.1.2. Poliploidia induzida e melhoramento.....	14
2.2.1.2.1. Gametas não reduzidos.....	17
2.2.1.3. Outras considerações sobre poliplóides.....	28
2.2.1.4. Poliploidia e melhoramento em trevo vermelho.....	30
2.2.1.5. Efeitos negativos da poliploidia.....	37
2.3. Método de seleção para trevo vermelho.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1. Experimento 1.....	44
3.1.1. Semeadura.....	44
3.1.2. Transplante para vasos.....	45
3.1.3. Determinações do experimento.....	45
3.1.3.1. Análises de grãos de pólen para identificação de plantas produtoras de pólen gigantes.....	45
3.1.3.2. Poliplóides importados.....	47
3.1.3.2.1. Análises de grãos de pólen.....	48
3.1.3.2.2. Determinação do número cromossômico..	47
3.1.3.3. Cruzamentos e ciclos de seleção.....	49
3.1.3.4. Análises gerais das progênies.....	51
3.2. Experimento 2.....	52
3.3. Análise de dados.....	53
3.3.1. Experimento 1.....	53
3.3.2. Experimento 2.....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1. Considerações sobre a implantação e condução do experimento.....	60
4.2. Experimento 1.....	61
4.2.1. Testes de germinação.....	61

	Página
4.2.2. Primeiro ciclo de seleção.....	61
4.2.2.1. Análises dos grãos de pólen e seleção de plantas diplóides.....	61
4.2.2.2. Avaliação das plantas poliplóides importadas.....	69
4.2.2.2.1. Considerações sobre a sobrevivência dessas plantas.....	74
4.2.2.3. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes..	77
4.2.3. Segundo ciclo de seleção.....	79
4.2.3.1. Análises gerais da progênie.....	79
4.2.3.2. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes....	90
4.2.4. Terceiro ciclo de seleção.....	92
4.2.4.1. Análises gerais da progênie.....	92
4.2.4.2. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes..	96
4.2.5. Quarto ciclo de seleção.....	96
4.2.5.1. Análises gerais da progênie.....	96
4.2.5.2. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes..	102
4.2.6. Análises gerais do Experimento 1.....	104
4.3. Experimento 2.....	106
4.3.1. Primeiro ciclo de seleção.....	106
4.3.1.1. Análises dos grãos de pólen e seleção de plantas....	106
4.3.1.2. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes...	114
4.3.2. Segundo ciclo de seleção.....	117
4.3.2.1. Análises dos grãos de pólen e seleção de plantas....	117
4.3.2.2. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes...	123
4.3.3. Terceiro ciclo de avaliações e seleção.....	125
4.3.3.1. Análises dos grãos de pólen e seleção de plantas...	125
4.3.3.2. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes..	133
4.3.3.3. Análises gerais do Experimento 2.....	135
5. CONCLUSÕES.....	140
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
7. APÊNDICES.....	152

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, número de porcentagem de produção de grãos gigantes das plantas selecionadas da cultivar Quiñiqueli no primeiro ciclo (Exp. 1).....	64
2. Freqüências de produção de grãos de pólen gigantes observadas nas plantas diplóides selecionadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 11).....	66
3. Tamanho médio e limites de tamanho dos grãos de pólen das plantas tetraplóides avaliadas no primeiro ciclo de seleção do Experimento 1...	73
4. Tempo de vida das 34 plantas poliplóides mantidas em condições de casa de vegetação no primeiro ciclo de seleção do Experimento 1.....	75
5. Produção de sementes dos cruzamentos 4X-2X no primeiro ciclo de seleção do Experimento 1.....	77
6. Tamanho dos grãos de pólen, número cromossômico e estabilidade do pólen de plantas de trevo vermelho pertencentes ao segundo ciclo de seleção (Exp. 1).....	80
7. Produção de sementes nas plantas de trevo vermelho no segundo ciclo de seleção (Exp. 1).....	90
8. Número cromossômico, tamanho médio e estabilidade do pólen de plantas de trevo vermelho pertencentes ao terceiro ciclo de seleção (Exp.1).....	93
9. Produção de sementes dos cruzamentos manuais realizados em plantas de trevo vermelho no terceiro ciclo de seleção (Exp.1).....	96
10. Número cromossômico, tamanho médio e estabilidade do pólen de plantas de trevo vermelho pertencentes ao quarto ciclo de seleção (Exp.1).....	98
11. Freqüências de diferentes números cromossômicos somáticos registrados nas plantas do quarto ciclo de seleção.....	99
12. Produção de sementes dos cruzamentos manuais realizados em plantas de trevo vermelho no quarto ciclo de seleção (Exp.1).....	103
13. Número de plantas produtoras de pólen gigante nas três populações diplóides de trevo vermelho avaliadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 2).....	107
14. Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, número de porcentagem de produção de grãos gigantes das plantas selecionadas das cultivares Q (Quiñiqueli), R (Redland) e K (Keenland) no primeiro ciclo (Exp 2).....	108
15. Freqüências de surgimento de grãos de pólen gigantes observadas nas plantas selecionadas da população diplóide no primeiro ciclo de seleção (Exp. 2).....	112
16. Produção de sementes nas plantas da população selecionada no primeiro ciclo de seleção (Exp. 2).....	115

	Página
17. Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, viabilidade do pólen e ocorrência de grãos gigantes nas plantas selecionadas no segundo ciclo do Experimento 2.....	119
18. Frequências de surgimento de grãos de pólen gigantes observadas nas plantas selecionadas da população diplóide no segundo ciclo de seleção (Exp. 2).....	121
19. Comparação entre as médias das 12 famílias avaliadas para porcentagem de produção de pólen gigantes no segundo ciclo de seleção (Exp. 2).....	124
20. Produção de sementes nas plantas da população selecionada no segundo ciclo de seleção (Exp. 2).....	125
21. Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, viabilidade do pólen e ocorrência de grãos gigantes nas plantas selecionadas no terceiro ciclo (Exp 2).....	127
22. Frequências de surgimento de grãos de pólen gigantes observadas nas plantas selecionadas da população do terceiro ciclo de seleção (Exp. 2).....	129
23. Comparação entre as médias das 18 famílias avaliadas para porcentagem de produção de pólen gigantes no terceiro ciclo de seleção (Exp. 2).....	131
24. Produção de sementes nas plantas da população selecionada no terceiro ciclo de seleção (Exp. 2).....	134
25. Desempenho médio das três famílias quanto à frequência de produção de grãos de pólen gigantes nas plantas selecionadas nos três ciclos de seleção do Experimento 2.....	136
26. Desempenho das famílias dentro dos três ciclos de seleção quanto à frequência de produção de grãos de pólen gigantes nas plantas selecionadas do Experimento 2.....	137
27. Frequência média de produção de grãos de pólen gigantes das plantas selecionadas nos três ciclos de seleção do Experimento 2.....	138

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Páginas
1. Ilustração do procedimento utilizado para realizar as polinizações manuais a) exposição do estigma no progenitor feminino; b) coleta de pólen no progenitor masculino (Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2000).....	50
2. esquema dos cruzamentos realizados nos quatro ciclos de seleção do Experimento 1.....	55
3. a) Aspecto geral da casa de vegetação com as plantas da população diplóide estabelecidas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 1); b) aspecto das inflorescências de trevo vermelho; c) inflorescência de trevo vermelho vista em detalhe (Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2000).....	62
4. Aspecto dos grãos de pólen normais (menores) e gigantes (maiores) encontrados nas amostras analisadas durante a fase de detecção de plantas produtoras de gametas não reduzidos.....	68
5. a) Planta T2-5 (28 cromossomos); b,c,d) planta T1-8: mais de 28 cromossomos, menos de 28 cromossomos e 28 cromossomos, respectivamente; e) planta T2-17 (14 cromossomos).....	71
6. Diferenças morfológicas encontradas em plantas diplóides e tetraplóides: a) folhas (esquerda, planta diplóide e direita, planta tetraplóide); b) inflorescências (esquerda, planta diplóide e direita, planta tetraplóide) (Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2000).....	76
7. Planta T1-2 I1, pertencente ao segundo ciclo de seleção (Exp. 1) (Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2001).....	81
8. Cromossomos das plantas do segundo ciclo de seleção (Exp. 1): a) T2-12 I1 (triplóide); b) T1-4 I2 (tetraplóide).....	81
9. Planta T1-4 I6: aspecto dos grãos de pólen: normal, gigante e inviáveis (parcialmente cheios e micropólen vazio).....	86
10. Cromossomos das plantas do terceiro ciclo de seleção (Exp. 1): a) planta “b” (28 cromossomos); b, c) planta “c” (21 e 28 cromossomos, respectivamente); d, e, f) planta “e” (9,12 e 28 cromossomos, respectivamente).....	95
11. Cromossomos da planta “e4” do quarto ciclo de seleção (Exp. 1): a) 28 cromossomos; b) menos de 28 cromossomos.....	100

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Cv – cultivar
DS – diferencial de seleção
Exp. 1 – Experimento 1
Exp. 2 – Experimento 2
GS – ganho de seleção
I -irmão
K – cultivar Keenland
NEB – Núcleo endospermico balanceado
nf – não floresceu
NP – não polinizada
NR – Não registrado
Q - cultivar Quiñiqueli
R – cultivar Redland
RPD – Restituição da primeira divisão
RSD – Restituição da segunda divisão
 μm – micrômetros

1. INTRODUÇÃO

Para as pastagens da região Sul do Brasil, há uma permanente procura por espécies forrageiras de boa qualidade para alimentação do gado durante os períodos mais frios do ano. Isto porque os campos nativos não oferecem espécies produtoras de inverno que supram as necessidades alimentares dos animais. Uma maneira de tentar minimizar as perdas ocorridas no inverno é através da introdução de forrageiras de estação fria. Entre as espécies forrageiras temperadas, trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) pode ser uma boa alternativa. Esta leguminosa possui uma forragem de excelente qualidade, é fixadora de nitrogênio e apresenta uma boa produção de matéria seca. Porém, em nosso Estado, as cultivares que estão disponíveis apresentam problemas de persistência, pois não foram desenvolvidas para essas condições de clima e solo, limitando sua utilização em condições ambientais desfavoráveis. Para ser utilizada com maior potencialidade, um programa de melhoramento aplicado nesta cultura pode contribuir para o desenvolvimento de plantas com maior adaptabilidade geral. Isto significa que trevo vermelho poderá persistir e produzir satisfatoriamente por um período maior de tempo em determinadas áreas de cultivo.

Este trabalho faz parte do programa de Melhoramento Genético de Trevo Vermelho que está sendo desenvolvido no Departamento de Plantas

Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O projeto de pesquisa tem por objetivo avaliar e selecionar materiais de trevo vermelho adaptados às condições ecológicas do Rio Grande do Sul, incluindo o melhoramento e a seleção de plantas persistentes com altas taxas de produção de matéria seca.

Uma das alternativas é aumentar sua base genética, através de seleção de plantas poliplóides, e desta forma tornar possível obter materiais que tenham as características necessárias para sua adaptação à região Sul do Brasil.

Especificamente neste projeto de tese, o objetivo foi aumentar a frequência de produção de gametas não reduzidos em plantas de trevo vermelho, a partir de populações selecionadas, utilizando ciclos de seleção para, futuramente, viabilizar a produção de poliplóides sexuais. Trevo vermelho poliplóide pode ser uma boa alternativa para a utilização desta leguminosa como forragem, uma vez que plantas poliplóides sexuais, com maior variabilidade genética, podem mostrar-se mais estáveis e produtivas, condições essenciais para o sucesso do estabelecimento desta importante forrageira no Sul do país.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O trevo vermelho

2.1.1. Origem e distribuição

Trevo vermelho, *Trifolium pratense* L., é uma espécie pertencente à subfamília Faboideae, família Leguminosae, tribo Trifolieae, seção *Trifolium* (Zohary & Heller, 1984).

O sudeste da Eurásia, próximo ao Mar Mediterrâneo, é um dos três maiores centros de diversidade do gênero *Trifolium*. *T. pratense* é originária do sudeste da Europa e Ásia Menor. Esta espécie forrageira adapta-se melhor em ambientes com climas temperados, sem extremos de frio ou calor, solos férteis, profundos e bem drenados, com pH relativamente alto, podendo ser usado como silagem, feno, pasto e melhoramento do solo em muitas regiões do mundo (Fergus & Hollowel, 1960; Taylor & Smith, 1979, 1995; Taylor & Quesenberry, 1996).

A espécie se distribui por toda a Europa (exceto no extremo Norte), oeste da Ásia e região Mediterrânea. Muitas cultivares encontram-se amplamente distribuídas em todo o Hemisfério Norte (Zohary & Heller, 1984). Em regiões temperadas da Europa, Rússia, Austrália, Argentina, Chile, Nova Zelândia, Japão, México, Colômbia e sul do Canadá, esta espécie

fixadora de nitrogênio é utilizada por sua significativa importância como produtora de forragem. Nos Estados Unidos, o trevo vermelho mantém uma importante posição na produção de forragem (Fergus & Hollowel, 1960; Taylor & Smith, 1979, 1995; Taylor & Quesenberry, 1996).

Trevo vermelho é um diplóide natural ($2n=2x=14$), não havendo evidências que formas tetraplóides desta espécie ocorram naturalmente (Parrott & Smith, 1984). Segundo Caradus & Williams (1995), há estudos que indicam que trevo vermelho está mais relacionado com os trevos anuais *Trifolium diffusum* e *T. pallidum*, ambos com número básico $n=8$, do que com os trevos perenes. Estas evidências são baseadas em análises citogenéticas de híbridos interespecíficos, que sugerem que a especiação é resultado de uma série complexa de mudanças estruturais nos cromossomos, causando diferenciação cromossômica e eventual perda de um par de cromossomos em *T. pratense*.

2.1.2. Características morfológicas

Trevo vermelho é uma planta herbácea, com numerosas ramificações caulinares que nascem a partir da coroa (Zohary & Heller, 1984; Taylor & Smith, 1995). Na América, os caules e as folhas das plantas geralmente são pilosas, mas na Europa, elas são lisas. As folhas são alternas, sendo a primeira unifoliolada e as sucessivas geralmente apresentam três folíolos, mas variações existem (de um até oito folíolos) (Taylor & Smith, 1995) e estão condicionadas a dois genes recessivos, *f* e *n* (Taylor & Smith, 1979). As

plantas desta espécie têm uma raiz principal e muitas raízes secundárias (Taylor & Smith, 1995).

As flores são reunidas em inflorescências: capítulos terminais com mais de 125 flores, segundo Taylor & Smith (1979,1995) ou até 300 flores (Taylor & Quesenberry, 1996). Normalmente as flores estão situadas em pedúnculos para formar uma simples inflorescência e, em raros casos, inflorescências múltiplas (Taylor & Smith, 1979). A flor de trevo vermelho é uma flor típica de leguminosa: tubulosa, consiste de cálice, corola, dez estames e um pistilo (Taylor & Smith, 1979; Taylor, 1980), de cor púrpura ou avermelhada (Taylor, 1987; Taylor & Smith, 1995). As cinco pétalas (uma estandarte, duas alas e duas quilhas) são unidas pela base e formam o tubo da corola. A coluna sexual é formada por nove estames e um estigma unidos; o décimo estame é livre. Os estigmas das flores ficam receptíveis ao pólen antes das pétalas alcançarem sua completa extensão (Taylor & Smith, 1979; Taylor, 1980, 1987; Taylor & Quesenberry, 1996).

2.1.3. Modo de reprodução

O trevo vermelho é uma espécie alógama e auto-incompatível que, sob condições naturais, produz poucas sementes através de autofecundação. Devido à morfologia das flores, com a coluna sexual protegida dentro da corola, há a necessidade de insetos polinizadores para ocorrer fecundação (Taylor & Smith, 1979).

O mecanismo de auto-incompatibilidade gametofítica é controlado por uma série de alelos S presente em um *locus* que governa o crescimento do

tubo polínico, exigindo que a fecundação seja cruzada (Taylor & Quesenberry, 1996; Taylor, 1987). No sistema de alelos S, as plantas que possuem os mesmos alelos S previnem a autofecundação devido ao atraso do crescimento do tubo polínico através do estilete (Taylor & Smith, 1979). Grãos de pólen intraespecíficos, de genótipos compatíveis ou incompatíveis, germinam facilmente no estigma. Porém, após um curto período de rápido crescimento, os tubos polínicos dos tipos incompatíveis retardam e finalmente cessam o crescimento (Taylor & Quesenberry, 1996). Nettancourt (1997, 2001) relatou cerca de 200 alelos S em populações naturais de trevo vermelho.

Apesar do trevo vermelho diplóide exibir um típico sistema de auto-incompatibilidade gametofítica, há uma limitada quantidade de pseudo-auto-compatibilidade ocorrendo nas plantas (Taylor, 1982; Taylor & Smith, 1979; Taylor & Quesenberry, 1996).

A transferência de pólen é feita por insetos, geralmente abelhas. Porém abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) não alcançam as flores, por isso o trevo vermelho não se torna atrativo, particularmente se há fontes alternativas de néctar (Davies, 1971). Já abelhões (*Bombus* spp.) são eficientes polinizadores (Taylor & Smith, 1979, 1995; Taylor, 1980, 1987). A receptividade do estigma e a viabilidade do pólen permanecem por cerca de dez dias. Após a polinização, as sementes amadurecem fisiologicamente em 14 dias e se tornam secas e maduras após 21 dias (Taylor & Smith, 1979). As sementes são pequenas (de dois a três mm), com variação de cor, do puro amarelo a púrpura (Taylor & Smith, 1995).

2.1.4. Utilização e importância

Isolado ou em consorciações com gramíneas, o trevo vermelho revela altos índices de produção. Para o gado de corte, incorporar trevo vermelho em pastagens com gramíneas pode aumentar significativamente o desempenho e a produção animal. Com gado de leite, a boa qualidade da forragem faz do trevo vermelho uma espécie com potencial para utilização como forrageira. Também pode ser utilizado efetivamente para produção de carne de ovelha (Taylor & Quesenberry, 1996).

O trevo vermelho é perene, embora, às vezes, se comporte como bienal. A cultura usualmente vive por três a quatro estações na maioria das regiões de crescimento e, geralmente, apresenta falta de persistência após este período. A persistência pode ser definida como a habilidade em manter-se por um longo período de tempo sem depender de ressemeadura (Taylor & Quesenberry, 1996). Segundo Paim (1994), a persistência em uma pastagem é essencial, e a leguminosa deve superar tanto a competição com gramíneas associadas como os períodos em que as condições ambientais são desfavoráveis.

Em condições ambientais de estresse, como ocorre no Sul do Brasil, esta espécie sobrevive, no máximo, por um ou dois anos. Segundo Montardo (2002), a pouca persistência do trevo vermelho no Rio Grande do Sul decorre da interação entre vários fatores, que vão desde a deficiente correção e fertilização do solo, passando pelo manejo equivocado da cultura, até as condições climáticas de cada local. O último desses fatores é considerado realmente limitante, já que incidência de doenças, estresse hídrico e as altas

temperaturas são geralmente fatores associados a determinadas condições meteorológicas.

2.2. Genética, melhoramento e poliploidia

Uma maneira de contornar as limitações associadas ao cultivo do trevo vermelho é através de programas de melhoramento genético.

Muitos desses programas têm como objetivo aumentar a produção ou a estabilidade da produção. Melhoramento para adaptabilidade geral (habilidade das populações para persistir – aumentar a longevidade - e produzir satisfatoriamente em uma certa área) é normalmente a primeira meta de um programa (Taylor, 1987; Taylor & Quesenberry, 1996). Espécies temperadas como alfafa (*Medicago sativa*), trevo branco (*Trifolium repens* L.) e cornichão (*Lotus corniculatus* L.) produzem forragem de melhor qualidade se forem selecionadas simultaneamente para a melhor persistência, maior produção de matéria seca e resistência às principais pragas e moléstias (Paim, 1994).

Uma das alternativas para a procura de culturas melhor adaptadas a determinadas condições é desenvolver e selecionar plantas com maior variabilidade genética, pois estas podem tornar-se capazes de explorar ambientes diversos e superar adversidades onde plantas com reduzida variabilidade não conseguem adaptar-se.

O sucesso de qualquer programa de melhoramento está ligado a duas condições básicas: suficiente variabilidade genética das culturas a serem melhoradas e objetivos bem definidos. As espécies de fecundação cruzada, por

apresentarem, normalmente, variabilidade muito maior do que as plantas de autofecundação são um excelente material para programas de melhoramento (Paim, 1994).

2.2.1. Poliploidia

A poliploidia é um importante processo na evolução cromossômica dos eucariotos, onde três ou mais conjuntos cromossômicos compartilham o mesmo núcleo. Nas plantas, a poliploidia representa o maior mecanismo de adaptação e especiação (Ramsey & Schemske, 1998).

Cerca de 80% das angiospermas são poliplóides, evidenciando que a poliploidia tem um papel relevante na evolução de plantas superiores (Leitch & Bennet, 1997).

Organismos poliplóides podem surgir através de duplicação somática das células (poliplóides assexuais), método geralmente utilizado pelos melhoristas; ou através de gametas não reduzidos funcionais (poliplóides sexuais), que é a forma preponderante de origem de poliplóides naturais (Ramsey & Schemske, 1998).

Espera-se que plantas poliplóides sejam superiores para uma série de características quando comparadas com seus parentais diplóides. Características adaptativas são controladas por numerosos genes que estão distribuídos em vários cromossomos (De Wet, 1971). No processo da evolução poliplóide, o efeito da poliploidia em mutações individuais pode ter pequenas conseqüências, mas coletivamente, pode dar lugar a características diferentes que estão sob controle de múltiplos genes (Stebbins, 1971).

Além disso, o aumento do nível de ploidia pode ter uma vantagem seletiva porque “mascara” os efeitos de mutações deletérias, já que os poliplóides em geral têm um efeito “tamponante” sobre mutações encobertas devido ao grande número de genomas (Otto & Whitton, 2000).

Poliplóides naturais mantêm altos níveis de variação genética segregante através da incorporação da diversidade genética de múltiplas populações de seus genitores diplóides (Soltis & Soltis, 1999). Em plantas poliplóides com sistema de fecundação cruzada, a tendência é um aumento da frequência de indivíduos heterozigotos em algum *locus* simples (Evans, 1981).

Organismos poliplóides, formados por conjuntos genômicos idênticos são referidos como autopoliplóides (duplicação de cromossomos dentro de uma população) e aqueles que surgem por hibridação interespecífica, seguido de duplicação cromossômica, são denominados alopoliplóides (Ramsey & Schemske, 1998; Otto & Whitton, 2000).

A poliploidia leva à duplicação genômica e, conseqüentemente, à duplicação gênica. Segundo Wendel (2000), a duplicação gênica pode ter as seguintes conseqüências evolutivas: (a) genes adquirindo novas funções; (b) “silenciamento” de uma ou duas cópias duplicadas; (c) retenção da função original ou similar, persistindo a expressão gênica duplicada, que pode favorecer casos em que mutações de uma cópia gênica conduz a interações negativas com os produtos de outros genes essenciais; (d) interação entre genes duplicados: efeito de dose (quanto mais alelos, mais produtos).

Durante sua evolução natural, os poliplóides antigos conseguiram alcançar um balanço genético preciso para características quantitativas e

qualitativas em termos de interações alélicas e relação de dosagens de genes e desenvolveram mecanismos para explorar tipos de interações heteróticas não possíveis na herança dissômica (Hermsen, 1984b). Teoricamente, as razões que explicam a adaptação dos poliplóides revelam que estes têm uma maior chance de carregar novos alelos benéficos e evoluir para melhores funções em famílias de genes duplicados (Otto & Whitton, 2000).

Uma descoberta recente revelou que espécies poliplóides podem ter se originado mais de uma vez ao longo da evolução, isto é, apresentam múltiplas origens. Isto poderia explicar a complexidade taxonômica dos poliplóides, principalmente quando espécies genitoras diplóides têm uma ampla distribuição geográfica, como por exemplo, o gênero *Draba* (Brassicaceae) (Leitch & Bennet, 1997). Esta idéia das múltiplas origens foi verificada através de análises moleculares, aliadas a estudos comparativos de ecofisiologia, ecologia de populações e outros tópicos relacionados. Múltiplas origens supõem a introdução da variabilidade em poliplóides. Esta característica fornece, assim, um metabolismo flexível para que espécies poliplóides ocorram com sucesso na natureza (Soltis et al., 1992). Todos estes estudos confirmam que a poliploidia é um processo bastante dinâmico (Carputo et al., 2003).

As formas com número cromossômico duplicado são de grande importância nas plantas cultivadas. Eventos de especiação poliplóide, com a ocorrência de ciclos de duplicação de genomas são evidentes em muitas culturas economicamente importantes: batata (*Solanum tuberosum*) (Hermsen, 1984b; Leitch & Bennet, 1997; Wendel, 2000), trigo (*Triticum aestivum*), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), algodão (*Gossypium hirsutum*) (Leitch &

Bennet, 1997; Wendel, 2000), soja (*Glycine max*), batata doce (*Ipomoea batatas*), *Brassica* (Wendel, 2000), alfafa (*Medicago sativa*) (Hermsen, 1984b), morango (*Fragaria ananassa*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e café (*Coffea arabica*) (Leitch & Bennet, 1997).

Outros exemplos de poliplóides naturais incluem: banana (*Musa sapiens*), *Dactylis glomerata*, capim “timothy” (*Phleum pratense*), *Agropyron cristatum* (Hermsen, 1984b), trevo branco (*Trifolium repens*) (Zohary & Heller, 1984) e cornichão (*Lotus corniculatus*) (Beuselinck et al., 2003). O milho, espécie considerada diplóide até recentemente, na verdade é um tetraplóide, pois análises moleculares revelaram que esta cultura possui dois genomas distintos duplicados (Leitch & Bennet, 1997).

2.2.1.1. Mecanismos de formação poliplóide

Ramsey & Schemske (1998), em sua revisão sobre formação de poliplóides, comentaram que vários mecanismos citológicos são conhecidos para poliploidização de plantas. A maior rota de formação de poliplóides envolve a “não redução gamética” ou “restituição meiótica nuclear” durante a gametogênese. Este processo, que ocorre comumente na natureza, gera gametas não reduzidos (gametas $2n$) (Ramsey & Schemske, 1998).

Gametas não reduzidos contém o mesmo número cromossômico que as células somáticas do indivíduo, ou seja, apresentam número cromossômico esporofítico (Ramanna, 1992; Schifino-Wittmann & Dall’Agnol, 2001). A união destes gametas pode gerar embriões poliplóides (Ramsey &

Schemske, 1998). Gametas $2n$, por serem continuamente produzidos, causam uma contínua produção de novos poliplóides (De Wet, 1971).

Atualmente, tem sido aceito que os poliplóides naturais tenham surgido pela união de gametas não reduzidos e não por duplicação somática (Harlan & de Wet, 1975; Hermsen, 1984a; Veilleux, 1985; Bretagnolle & Thompson, 1995; Briggs & Walters, 1997; Ramsey & Schemske, 1998; Carputo et al., 2003). Na duplicação somática, a restituição cromossômica ocorre durante a mitose de tecidos meristemáticos de esporófitos juvenis ou adultos, no estágio de zigoto ou em embriões jovens, gerando esporófitos completamente poliplóides (Carputo et al., 2003). O exemplo mais conhecido é o de *Primula "kewensis"*; porém, esse é um fenômeno considerado de pouca importância na evolução dos sistemas de poliploidização (Harlan & De Wet, 1975).

Carputo et al. (2003) destacaram três aspectos de gametas $2n$ e poliploidização sexual, que fazem com que poliploidização sexual e somática tenham consequências genéticas diferentes: 1º) A possibilidade de mais do que dois alelos por *locus* e diversidade no *locus* tetra-alélico ($A_1A_2A_3A_4$) fornece o máximo de heterozigidade, uma vez que gametas $2n$, resultantes de meiose modificada, transmitem altos níveis de heterozigose parental e epistasia. Na duplicação somática, toda a heterozigose parental é transmitida, mas se um indivíduo heterozigoto A_1A_2 é duplicado, um tetraplóide dialélico balanceado é formado e tem somente interações de primeira ordem, com altos níveis de depressão endogâmica; 2º) A progressiva introgressão é a base para os altos níveis de heterozigidade; então, poliplóides recém formados podem

possuir um amplo alcance de novos fenótipos, características fisiológicas e morfológicas sobre os quais a seleção natural atua; 3º) Quando progenitores diplóides produzem tanto oosferas $2n$ quanto pólen $2n$, eles determinam a origem dos poliplóides, resultando em diferenças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, bem como diferentes interações gênicas nuclear-citoplasmáticas. Como resultado, mais variabilidade genética é criada.

Na natureza, poucos poliplóides novos sobrevivem após uma geração. Eles devem competir por habitat com seus parentes diplóides ou colonizar novos ambientes. A maioria dos poliplóides produzidos (auto- e alopoliplóides) é menos fértil que seus parentes diplóides. O vigor e a habilidade competitiva envolvem amplos cruzamentos entre raças, ecótipos e citótipos dentro de uma mesma espécie biológica (Harlan & de Wet, 1975). Por isso, poliplóides perenes têm uma vantagem competitiva sobre os anuais, porque eles dispõem de muitas gerações para produzir novas combinações gênicas, com o aumento do desempenho (Hermsen, 1984b). Após o estabelecimento dos poliplóides, estes terão mais sucesso se forem de autofecundação e puderem se reproduzir assexuadamente. Duas mudanças no sistema reprodutivo dos poliplóides refletem justamente estas condições: quebra do sistema de auto-incompatibilidade, que induz ao aumento das taxas de autofecundação e reprodução assexual, mais precisamente a apomixia. A literatura ressaltou que a maioria das plantas apomíticas é poliplóide (Otto & Whitton, 2000).

2.2.1.2. Poliploidia induzida e melhoramento

Stebbins (1947) afirmou que o uso experimental de poliplóides é uma maneira de melhorar a utilização das plantas cultivadas. De fato, poliplóides artificiais são produzidos com frequência em programas de cruzamentos de plantas (Griffiths et al., 1998). Para o melhoramento, a mera produção de novos poliplóides deve ser somente o primeiro degrau em um laborioso trabalho (Levan, 1939).

Em 1928, o citologista russo Karpechenko sintetizou o primeiro alopoliplóide: cruzando plantas de rabanete (*Raphanus*) e de couve (*Brassica*), verificou que, na progênie estéril das plantas híbridas, havia algumas plantas férteis. Ao determinar o número cromossômico destas plantas, verificou que eram poliplóides. Estas plantas provavelmente surgiram pela união de gametas não reduzidos. Foi criada, espontaneamente, uma nova espécie, sem possibilidade de trocas gênicas com seus genitores. Ele chamou esta nova espécie de Raphanobrassica (Griffiths et al., 1998).

Porém, a primeira cultura produzida artificialmente e que obteve um sucesso parcial foi o *Triticale*, um alopoliplóide que combina os genomas do trigo (*Triticum*) e do centeio (*Secale*) (Leitch & Bennet, 1997). O *Triticale* tentou combinar a alta produtividade do trigo com o vigor do centeio (Griffiths et al., 1998).

Programas de melhoramento de autopoliplóides artificiais foram desenvolvidos com sucesso em trevos, gramíneas, beterraba e espécies ornamentais diplóides, sendo a rosa cultivada (*Rosa hybrida* L.), um bom exemplo (El Mokaden et al., 2002).

Taylor & Quesenberry (1996) citaram que, em trevo vermelho, métodos convencionais para produção de plantas tetraplóides utilizam colchicina ou óxido nitroso (indução química) que duplicam tecidos somáticos. A aplicação de colchicina é feita nos primeiros estágios de desenvolvimento da plântula. Este é o método químico mais utilizado, porém apresenta limitações, pois a porcentagem de plantas duplicadas é baixa e a ocorrência de mixaplóides e, especialmente em trevo vermelho, a freqüência de quimeras é alta. Além disso, por ser um método assexual, resulta em menos heterozigidade e maior depressão endogâmica devido a menor diversidade genética dos alelos.

Para superar as dificuldades encontradas para a aplicação de colchicina, um trabalho com trevo vermelho desenvolvido por Taylor et al. (1976), mostrou que o óxido nitroso (aplicado em tecidos florais após a polinização) é uma técnica mais eficiente, pois a freqüência de duplicação é maior, não há quimeras e a fertilidade em geral é alta. Porém, este método requer equipamento mais especializado e pode tornar-se pouco viável.

Mesmo assim, a duplicação somática é muito utilizada em diversas culturas, por várias razões, entre elas: (a) obtenção de autopoliplóides artificiais de culturas diplóides; (b) síntese de culturas alopoliplóides de espécies ancestrais diplóides; (c) produção de alopoliplóides para usar como uma ponte fértil para transferência de genes dentro de variedades; (d) facilidade de cruzamentos entre pais com diferentes níveis de ploidia por igualar o número cromossômico (Hermsen, 1984b).

Evans (1955) relatou um trabalho de indução de poliploidia com a aplicação de colchicina em trevo vermelho, trevo branco e alfafa. Seu trabalho constou da aplicação da droga seguida de avaliações de tamanho de estômatos, grãos de pólen e quantidade de pêlos nas folhas como uma forma de classificar previamente algumas plantas tetraplóides. O autor obteve 9% de plantas de trevo vermelho, 8,6% de trevo branco e 5% de plantas de alfafa que possuíam algum tecido poliplóide após o tratamento.

Uma maneira alternativa de induzir poliploidia em trabalhos de melhoramento é através da poliploidização sexual, que pode ser viabilizada através da busca e seleção de plantas produtoras de gametas não reduzidos que ocorrem naturalmente (Parrott & Smith, 1984; Taylor & Wiseman, 1987). Ramanna & Jacobsen (2003) citaram que poliplóides derivados de gametas não reduzidos funcionais têm mostrado uma maior relevância no melhoramento de várias culturas em muitos casos.

A poliploidização sexual, além de ser utilizada para transferir genes desejáveis entre níveis de ploidia diferentes (Parrott & Smith, 1984; Ramanna, 1992; Ramsey & Schemske, 1998), também pode promover o aumento da variabilidade (devido à ampliação da base genética), a adaptação e a qualidade das culturas (Schifino-Wittmann & Dall'Agnol, 2001).

2.2.1.2.1. Gametas não reduzidos

Gametas com número cromossômico esporofítico, ou gametas não reduzidos ou ainda, gametas $2n$, formam-se devido a anormalidades nas fases meióticas durante a micro e megasporogênese (Veilleux, 1985). Estes

distúrbios meióticos conduzem à não redução do número cromossômico gamético. Na fase meiótica, a não redução cromossômica dos gametas ocorre basicamente de duas formas, dependendo do modo de restituição nuclear. Sem a ocorrência de anormalidades, na meiose I, ocorrem duas divisões sucessivas na célula meiótica: a primeira leva à separação dos cromossomos homólogos pareados e a segunda leva à separação das cromátides irmãs de cada cromossomo. Nas falhas meióticas da primeira divisão, chamadas RPD (restituição da primeira divisão), não ocorre pareamento na metáfase e/ou a separação dos cromossomos homólogos na anáfase I, ou seja, a primeira divisão ocorre como se fosse uma divisão mitótica. A meiose II ocorre normalmente, mas resulta em duas díades ao contrário da tétrade esperada. A outra forma de surgimento de gametas $2n$ é na meiose II, pela RSD (restituição da segunda divisão), em que o pareamento e a separação dos cromossomos homólogos ocorre normalmente durante a meiose I, mas as cromátides irmãs não separam durante a segunda divisão meiótica; esta falha restitui núcleos diplóides, com formação de díades ou tríades. As conseqüências genéticas são diferentes na RPD e na RSD. Considerando que os gametas resultantes da RPD possuem duas cromátides não irmãs, enquanto que os gametas da RSD possuem duas cromátides irmãs, mais altas taxas de heterozigose são transmitidas às progênes através da RPD (Hermsen, 1984a; Bretagnolle & Thompson, 1995; Schifino-Wittmann & Dall'Agnol, 2001; Ramanna & Jacobsen, 2003). Se heterozigose, epistasia e diversidade genética estão presentes nos genótipos diplóides parentais, estes são mantidos na formação de gametas $2n$ via RPD (Den Nijs & Peloquin, 1977).

Gametas $2n$ podem ser detectados através de análise citológica, principalmente pela presença de grãos de pólen com tamanho de 30 a 40% maiores que os grãos normais (“macropólens” ou “gigantes”) e pela presença de díades ou tríades no final da telófase II (Hermsen, 1984a; Ramanna, 1992).

A maioria dos trabalhos relata a detecção de gametas não reduzidos na parte masculina (microsporogênese). Isto se deve a maior facilidade de estudar a meiose masculina, tétrades e grãos de pólen. Porém, o processo é comum nos dois lados (tanto na mega quanto na microsporogênese) e ocorre em frequências altamente variáveis. A detecção de gametas $2n$ no lado feminino é feita indiretamente, através de análises da progênie (Ramsey & Schemske, 1998; Schifino-Wittmann & Dall’Agnol, 2001). Veilleux (1985) afirmou que, em muitos casos, a frequência de gametas não reduzidos é tão baixa que análises meióticas conduzidas para detectar o mecanismo de sua formação podem ser inúteis.

Recentes descobertas na área de biologia molecular têm fornecido métodos mais precisos para avaliar gametas $2n$ e progênies poliplóides sexuais. Tais métodos incluem hibridações *in situ* (GISH e FISH) e mapeamento molecular (AFLP, RFLP e RAPDs) (Ramanna & Jacobsen, 2003).

A poliploidização sexual pode ser unilateral, ou seja, ocorrer pela união de um gameta normal com um não reduzido ($2X-4X$ ou $4X-2X$). Nos cruzamentos $2X-4X$, as plantas diplóides são usadas como progenitoras femininas; então, gametas femininos não reduzidos resultarão em uma semente tetraplóide; na outra direção ($4X-2X$), a não redução masculina é envolvida. Alternativamente, plantas produzindo gametas $2n$ masculinos e

femininos podem ser usadas em cruzamentos 2X-2X (poliploidização bilateral) e alguma progênie tetraplóide pode ter poliplóides sexuais bilaterais (Mendiburu & Peloquin, 1977a; Den Nijs & Peloquin, 1977; Hermsen, 1984b; Schifino-Wittmann & Dall'Agnol, 2001). A poliploidização sexual bilateral inicia com dois diplóides dando lugar a um tetraplóide. Porém, tanto nos cruzamentos bilaterais quanto nos unilaterais, é possível o surgimento de plantas triplóides, pela união de um gameta reduzido (n) com um gameta não reduzido ($2n$). Se estas não forem completamente estéreis, podem se tornar uma ponte para a formação de tetraplóides. Então, triplóides podem estar envolvidos na evolução dos poliplóides (Den Nijs & Peloquin, 1977). Porém, há muitas dificuldades na formação e manutenção de plantas triplóides. Bretagnolle & Thompson (1995), em sua revisão sobre gametas não reduzidos, afirmaram que, em cruzamentos recíprocos interplóides ($4X-2X$ ou $2X-4X$), utilizando plantas com conhecida produção de gametas $2n$, há uma relativa ou total falta de triplóides entre a progênie, devido ao efeito chamado “bloco triplóide”. Este efeito é causado pelo aborto de sementes triplóides devido à total ou parcial falta de tecido do endosperma associado ao embrião (desequilíbrio embrião-endosperma). O chamado número endospermico balanceado (NEB) é necessário para o sucesso dos cruzamentos, onde deve ocorrer uma proporção de genoma materno-paterno de 2:1 para o sucesso da viabilidade do endosperma híbrido (Bretagnolle & Thompson, 1995; Carputo et al., 2003). Esta é uma maneira de evitar hibridações entre pais com diferentes níveis de ploidia dentro de uma espécie e entre espécies. Vários estudos têm demonstrado que o NEB está sob controle de genes com efeito aditivo (Carputo et al., 2003). Parrott & Smith

(1986b) forneceram evidências que o NEB opera em *Trifolium*, e sugeriram que este pode ser um fator que cria barreiras para cruzamentos interespecíficos no gênero.

Otto & Whitton (2000) referiram-se aos triplóides como um obstáculo para a formação de novos tetraplóides, e seriam considerados um “beco sem saída” evolutivo, já que têm baixa fertilidade e tendem a produzir gametas aneuplóides, devido a problemas de pareamento cromossômico e segregação durante a meiose. Ainda assim, os autores sugeriram que esses gametas aneuplóides podem levar à produção de uma descendência triplóide ou tetraplóide. Como consequência, os triplóides podem agir facilitando a transição de diploidia para tetraploidia, ajudando a propagar linhagens poliplóides, embora em baixas taxas.

Ramsey & Schemske (1998) afirmaram que a barreira para a formação de triplóides não é completa, e em algumas plantas o endosperma é capaz de tolerar balanços diferentes, por isso os triplóides conseguem sobreviver. Os autores referiram-se aos triplóides como sendo freqüentemente semi-estéreis, podendo gerar novos poliplóides através da chamada “ponte triplóide”. Vários autores citados por Bretagnolle & Thompson (1995) também relataram que o bloco triplóide não é suficientemente forte para impedir a produção de sementes triplóides.

Hibridações artificiais utilizando gametas não reduzidos superam barreiras de cruzamento entre vários níveis de ploidia, proporcionando oportunidade para um contínuo fluxo de genes (Den Nijs & Peloquin, 1977). Mais recentemente, Carputo et al. (2003) afirmaram que gametas $2n$ podem

ser um material essencial para o melhoramento genético de genótipos cultivados porque transmitem diversidade alélica, e genes úteis de espécies selvagens podem ser incorporados em “pools” gênicos cultivados através de esquemas de cruzamentos e poliploidização sexual.

Muitos trabalhos registraram a ocorrência de gametas não reduzidos em muitas culturas, comprovando o aparecimento natural dessas formas anormais de gametas. Alguns exemplos: gênero *Leucaena* (Schifino-Wittmann & Simioni, 1998, 1999; Schifino-Wittmann et al., 1997, 2000), azevém (*Lolium perene*) (Wagenvoort & Den Nijs, 1992), *Dactylis glomerata* L. (Lumaret et al., 1992), *Lotus tenuis* (Negri, 1992), *Trifolium nigrescens* (Bullitta & Smith, 1992), alfafa (Vorsa & Bingham, 1979; McCoy, 1982; McCoy & Smith, 1983; Veronesi et al., 1986; Tavoletti et al., 1991b; Mariani et al., 1992), batata (Peloquin et al., 1992; Conicella et al., 1992; Ramanna & Jacobsen, 1992; Roussele-Bourgeois, 1992), banana (Ortiz, 1997), trevo branco (Hussain & Williams, 1997), batata doce (Becerra Lopez-Lavalle & Orjeda, 2002) e trevo vermelho (Parrott & Smith, 1984, 1986c; Parrott et al., 1985; Mousset-Declas et al., 1992).

Para o melhoramento de autopoliplóides como a batata, alfafa, *Vaccinum* spp. e algumas gramíneas forrageiras, os gametas não reduzidos formados via RPD provaram ter um grande sucesso para a poliploidização destas culturas (Ramanna & Jacobsen, 2003).

Trabalhos de genética e melhoramento utilizam gametas $2n$ para possibilitar o cruzamento de plantas com níveis de ploidia diferentes. Em alfafa (Bingham & Gillies, 1971; Mcoy, 1982) e batata (Peloquin et al., 1989, 1992), gametas não reduzidos de diplóides selvagens elevam seu nível de ploidia,

possibilitando a transferência de germoplasma para o nível tetraplóide cultivado.

Vários autores relataram que há maximização da heterozigosidade no nível tetraplóide se gametas não reduzidos via RPD (principalmente) forem os responsáveis pela duplicação do número cromossômico de culturas como alfafa (Vorsa & Bingham, 1979; McCoy & Rowe, 1986; Veronesi et al., 1986; Barcaccia et al., 1998) e batata (Mendiburu & Peloquin, 1977a; 1977b; Peloquin et al., 1989; Carputo et al., 2003). Para os cromossomos da batata, a heterozigosidade calculada é cerca de 80% em gametas da RPD e próximo a 40% nos gametas da RSD (Hermsen, 1984a). Nesta cultura, o método é ainda mais eficaz por ter reprodução assexuada.

Em trevo vermelho, um estudo de Parrott & Smith (1984) revelou que o pólen $2n$ é resultado de fusos paralelos ou tripolares durante a anáfase II da microsporogênese. Este mecanismo é geneticamente equivalente a RPD no modo de formação gamética.

McCoy & Rowe (1986) compararam experimentalmente plantas tetraplóides de alfafa vindas de duplicação somática e duplicação sexual. Teoricamente, gametas $2n$, formados via RPD de plantas diplóides, tinham 12,5 a 50% a mais de heterozigose do que os gametas n dos tetraplóides vindos de duplicação somática. Um ganho de produção de 12 a 32% foi alcançado com a progênie da RPD *versus* a progênie de gametas n dos tetraplóides. Esses resultados demonstram que RPD fornece um caminho único para maximizar a heterozigosidade em alfafa, confirmando sua importância para a melhora do vigor da alfafa (Vorsa & Bingham, 1979).

Mendiburu & Peloquin (1977a; 1977b) afirmaram que batatas tetraplóides são superiores porque a formação de pólen $2n$ ocorre na RPD. Um estudo de Barone et al. (1997) identificou que a orientação dos fusos paralelos unidos na metáfase II é uma condição necessária para a formação de pólen $2n$, mas que algum outro mecanismo citológico deve estar envolvido na formação das díades. Conicella et al. (1992) estudaram o mecanismo citológico da formação de gametas não reduzidos em clones de batata que produziram mais de 60% de pólen $2n$. Foram observados fusos paralelos na anáfase II; esta anormalidade resulta em dois micrósporos $2n$ carregando cromátides não-irmãs, que são geneticamente equivalentes aos produtos da RPD. Becerra Lopez-Lavalle & Orjeda (2002) chegaram a esta mesma conclusão para formação de grãos de pólen $2n$ em batata doce. Em *Rosa hybrida*, uma espécie de rosa tetraplóide cultivada, um estudo citológico da microsporogênese revelou que a primeira divisão meiótica ocorreu normalmente, mas a segunda divisão foi caracterizada por anormalidades que afetaram a formação do fuso e levaram à formação de gametas não reduzidos (El Mokaden et al., 2002).

Em *Dactylis glomerata* L., gametas não reduzidos, que ocorrem em populações selvagens de subespécies diplóides, podem ser um meio de ampliar a base genética das populações tetraplóides domesticadas, já que estas apresentam uma redução na variância genética devido ao processo de seleção para domesticação (Lumaret et al., 1992).

No lado feminino, nas células mães de megásporos, as falhas (citocinese anormal) podem ocorrer tanto na RPD quanto na RSD em alfafa

(Pfeiffer & Bingham, 1983; Tavoletti, 1991; Tavoletti, 1994; Tavoletti et al., 1991a), resultando em oosferas não reduzidas. O mesmo acontece em batata, onde até cinco maneiras de formação de oosferas $2n$ foram identificadas, podendo ocorrer até mesmo mais de um mecanismo dentro de um mesmo clone (Werner & Peloquin, 1991; Ramanna & Jacobsen, 1992). No estudo de Conicella et al. (1992), em dois clones que produziram oosferas $2n$, houve omissão da meiose II, equivalente ao mecanismo da RSD. Jongedijk et al. (1991) citaram que a formação de megásporos $2n$ via RSD é o mecanismo que prevalece nesta cultura.

Um importante grupo de genes afeta o pareamento de cromossomos homólogos. Mutantes recessivos para assinapse ou dessinapse, tanto na micro- quanto na megasporogênese, são amplamente distribuídos no reino vegetal, causando esterilidade ou redução de gametas. Então, restituição nuclear em tais gametas pode levar à produção de gametas funcionais $2n$ (Hermsen, 1984a).

Após uma série de estudos, vários autores concordaram que os distúrbios meióticos são altamente herdáveis e, na maioria dos casos, em plantas, são controlados por um simples gene (Veilleux, 1985).

Peloquin et al. (1989, 1992) afirmaram que um gene mutante recessivo para fuso paralelo (*ps*) na microsporogênese controla a restituição gamética em batatas. Então, quando o gene *ps* está presente, os fusos são paralelos e uma díade com dois micrósporos $2n$ é formado no final da meiose (Carputo et al., 2003).

Em trevo vermelho, Parrott & Smith (1986a) encontraram evidências que a segregação para ausência ou presença de formação de pólen $2n$ é condicionado por um gene recessivo na condição homozigota em um *locus* simples. Porém, a frequência de produção por planta provavelmente está sob a influência de genes modificadores. A estimativa é que dois a seis genes controlam a frequência de formação de grãos de pólen não reduzidos nesta espécie (Parrott & Smith, 1986c).

Na alfafa diplóide, McCoy (1982) constatou que, em uma das plantas, a formação do pólen $2n$ era controlada por uma mutação em um gene recessivo simples com expressão variável. McCoy & Smith (1983) também relataram que o pólen “jumbo” nesta espécie ocorre em uma falha na citocinese, controlada por um gene recessivo resultante de mutação, denominado *jp*. Em um estudo de herança e mapeamento nesta espécie diplóide, as evidências moleculares e genéticas suportaram a idéia do envolvimento de, no mínimo, seis genes responsáveis pela formação de oosferas $2n$ (Barcaccia et al., 2000).

Embora a maioria dos casos relatados apontou que mutantes meióticos são normalmente recessivos, em *Musa*, no mínimo um gene dominante é necessário para produção de pólen $2n$. Esta conclusão foi obtida após análise de segregação da descendência nesta cultura (Ortiz, 1997).

Em espécies de *Solanum*, foi relatado que a formação de oosferas não reduzidas é causada por vários genes mutantes. Entre eles, o mais comum é o gene responsável pela omissão da segunda divisão meiótica (*os*). Quando o gene *os* está presente, não há segunda divisão meiótica após ter ocorrido a

primeira; isto resulta em dois megásporos $2n$: um dá origem a um gametófito feminino $2n$ e o outro degenera (Carputo et al., 2003). Em *Solanum tuberosum*, uma sinapse anormal dos cromossomos homólogos é controlada por um gene (*ds1*, mutante desinápico) com vários alelos, que afeta tanto a meiose feminina quanto a masculina (Bretagnolle & Thompson, 1995).

A variação na frequência de surgimento de gametas $2n$ pode ser atribuída a variados graus de penetrância e expressividade dos alelos mutantes responsáveis pela produção desses gametas, e também a fatores ambientais (Carputo et al., 2003). Hermsen (1984a) afirmou que todos os processos meióticos são regulados por genes que são sensíveis a fatores ambientais. Então, a produção de gametas não reduzidos, por ser um desvio da meiose normal, pode ser alterada por fatores ambientais como temperatura, herbivoria, ferimentos, doenças, estresse hídrico e nutricional (Ramsey & Schemske, 1998).

McCoy (1982) registrou, em alfafa, uma variação na frequência de aparecimento de pólen $2n$ entre diversas condições ambientais em casa de vegetação e também variação entre diferentes flores do mesmo clone dentro de um determinado ambiente. Certos clones produziram mais pólen $2n$ no outono e na primavera na casa de vegetação (25°C de dia e 20°C à noite), enquanto outros produziram a mais alta frequência em câmaras de crescimento (25°C constante e 30°C de dia e 10°C à noite).

Em uma avaliação com trevo vermelho, a produção de pólen $2n$ diminuiu quando as temperaturas aumentaram de 12 a 25°C (Mousset-DeClas et al., 1992). Parrott & Smith (1984) verificaram a estabilidade da produção de

pólen $2n$ em plantas individuais de trevo vermelho quando expostas a variadas condições ambientais em casa de vegetação. Foi verificada uma sensibilidade quanto à produção de pólen $2n$ com respeito ao ambiente, mas, para uma identificação inicial de plantas produtoras ou não de gametas não reduzidos, a distinção ambiental não se mostrou consistente.

Em *Musa*, Ortiz (1997) sugeriu que a alta radiação solar é um fator ambiental conveniente para produção de gametas $2n$.

Os dados apresentados mostram que a frequência de produção de gametas $2n$ é altamente variável entre espécies e dentro de espécies (Ramsey & Schemske, 1998). Dados de avaliação indicaram que o alcance para frequência de produção de gametas $2n$ varia de menos de 1% até mais de 35%, de acordo com Bretagnolle & Thompson (1995), e varia de um até 40%, segundo Carputo et al. (2003). Isto sugere que plantas tendem a manter altas frequências de gametas n para conservar seu nível diplóide enquanto seguem o processo de poliploidização (Carputo et al., 2003).

Veilleux (1985) concluiu que a frequência de ocorrência de gametas não reduzidos ocorre devido a “acidentes” de desenvolvimento influenciados por estresse ambiental, sendo esta a provável causa da ocorrência natural de poliplóides nas plantas, bem como de altos níveis de ploidia em hibridações interploidia nos programas de melhoramento.

2.2.1.3. Outras considerações sobre poliplóides

O efeito mais imediato da poliploidia é o aumento do tamanho celular e quase sempre há um aumento da planta como um todo, o chamado efeito “gigas”, ou de seus órgãos individuais. Entretanto, pode haver redução no

número de divisões celulares (Stebbins, 1971). Com isso, o desenvolvimento é mais lento, ocorre atraso reprodutivo e um ciclo de vida mais longo (atraso no florescimento e frutificação). Geralmente, a duplicação cromossômica nas plantas aumenta sua tolerância ao estresse. Também pode haver aumento da defesa contra patógenos e herbívoros e sementes maiores. O esforço reprodutivo tende a ser recompensado com ênfase na reprodução vegetativa (Hilu, 1993).

Para o melhoramento, a poliploidia produz diferenças em relação à condição diplóide, que podem, ou não, ser favoráveis. O comportamento dos poliplóides induzidos deve ser observado, porque é variável entre as espécies. Algumas características são comuns em plantas poliplóides: o peso total é maior, mas há espécies que produzem menos forragem na condição tetraplóide. Além disso, tetraplóides artificiais precisam passar por intenso processo de seleção, porque o rebrote é menos vigoroso. Em plantas forrageiras, é desejável obter plantas mais palatáveis; então, seleção contra órgãos individuais mais “grosseiros” torna-se necessário. O conteúdo de matéria seca é de dez a 20% menor, mas é possível selecionar populações para altos conteúdos de matéria seca (Hertzsch, 1960; Evans, 1981). Wagenvoort & Den Nijs (1992) afirmaram que a busca de gametas não reduzidos nas populações de azevém é um meio de obter poliplóides sexuais nesta espécie, já que cultivares tetraplóides apresentam excelente palatabilidade e resistência a várias doenças, embora sejam menos tolerantes ao pastejo e menos competidores com os diplóides.

Como já mencionado anteriormente, o uso da restituição gamética para maximizar a heterose foi amplamente utilizado em batata e alfafa, resultando em culturas melhoradas com sucesso, estimulando seu uso em trevo vermelho (Taylor & Quesenberry, 1996).

Um exemplo de programa de melhoramento que obteve êxito é o da batata, cujo objetivo foi desenvolver batatas comercializadas como batatas fritas do tipo “chips” que resistissem à estocagem em temperaturas baixas. Espécies selvagens 2X não acumulam açúcares nos tubérculos, o que provoca o escurecimento das batatas, quando estocadas a baixas temperaturas. Esta característica é indesejável para o comércio. Através de esquemas de cruzamentos 2X – 4X e 4X – 2X, gametas 2n foram hábeis para transmitir os alelos dominantes, responsáveis pela tolerância superior ao frio, em altas frequências para os genótipos cultivados tetraplóides. Este programa permitiu que a poliploidização sexual, juntamente com processos de seleção, desenvolvessem rapidamente batatas tipo “chips” tetraplóides resistentes ao frio, sem a característica do escurecimento dos tubérculos. Os tetraplóides híbridos apresentaram a característica da adaptação das cultivares tetraplóides, combinadas com a característica desejável das espécies diplóides (Hayes & Thill, 2002a; 2002b).

2.2.1.4. Poliploidia e melhoramento em trevo vermelho

Em certas regiões da Europa, tetraplóides de trevo vermelho induzidos quimicamente, algumas vezes são agronomicamente superiores quando comparados às formas diplóides, em termos de produção de forragem,

resistência a doenças e persistência (Taylor & Smith, 1979; Meglic & Smith, 1992).

Em um estudo para avaliar a influência da duplicação cromossômica na resistência ao fungo *Sclerotinia trifolium*, Vestad (1960) verificou que todas as famílias tetraplóides analisadas foram mais resistentes do que as famílias diplóides, com diferenças altamente significativas. Mousset-Déclas et al. (1993) avaliaram a variação de parâmetros de qualidade entre 24 variedades diplóides e 12 variedades tetraplóides de trevo vermelho, e constataram que, em termos de produção de matéria seca, variedades diplóides foram superiores às formas tetraplóides, mas inferiores para valores de proteína bruta, carboidratos solúveis em água e digestibilidade da matéria seca. Para silagem, todas as variedades produziram excelente ou boa qualidade, sem diferença entre diplóides e tetraplóides.

De acordo com Taylor & Quesenberry (1996), algumas características de trevo vermelho tetraplóide incluem: (1) quebra da auto-incompatibilidade, uma vez que a duplicação cromossômica desequilibra as relações dos alelos S que controlam a autofecundação, que ocorre em cerca de 3,1% de plantas em populações diplóides e de 0,8 a 7,2% em cultivares tetraplóides; (2) flores e sementes de formas tetraplóides são geralmente maiores do que em diplóides. O tubo da corola é maior, alcançando 7,9 a 11,3 mm de comprimento, tornando ainda mais difícil polinização por abelhas melíferas (*Apis mellifera*); (3) as sementes são mais pesadas do que as diplóides (2,67 a 2,77g comparadas a 1,73 a 2,05 g, peso de 1000 sementes); (4) há maior emergência de plântulas tetraplóides do que as vindas de

sementes diplóides, porém requerem maiores taxas de semeadura quando comparadas com diplóides; (5) a maioria dos trabalhos mostra aumento da resistência a doenças nas formas tetraplóides; (6) trabalhos desenvolvidos na Europa e Japão registraram maior persistência e produção de forragem para tetraplóides do que para diplóides, porém experiências americanas mostraram o oposto.

Otto & Whitton (2000) afirmaram que, com a modificação das características florais em poliplóides, as alterações nas interações bióticas com os polinizadores podem conduzir à seleção para divergência em características reprodutivas.

Taylor & Smith (1979) também citaram diferenças florais entre diplóides e tetraplóides: produção de néctar, comprimento e diâmetro do tubo da corola e preferência por polinizadores. Como tetraplóides têm o tubo da corola maior, mais largo e com maior volume de néctar do que os diplóides, *Bombus* spp. são os polinizadores mais efetivos para trevo vermelho poliplóide.

Davies (1971) descreveu que, em algumas variedades de trevo vermelho da Europa, o comprimento do tubo da corola é maior em populações das regiões do norte. Nestas regiões, as abelhas melíferas raramente visitam as flores de trevo vermelho. Plantas tetraplóides com o tubo da corola maior são visitadas mais vezes por espécies de *Bombus* que tem um maior comprimento da língua. Com essas observações, parece que uma espécie, *B. hortorum* se tornou o único polinizador de trevo vermelho que tem tubo da corola longo. Então, algumas evidências apontaram para o fato que, nas

regiões do norte da Europa, possam ocorrer populações tetraplóides naturalizadas de trevo vermelho.

Vários trabalhos relataram a ocorrência de gametas não reduzidos em trevo vermelho, indicando a possibilidade de utilizá-los em programas de melhoramento desta espécie. Alguns destes trabalhos são citados brevemente nesta revisão e serão mencionados com maiores detalhes no capítulo dos Resultados e Discussão, onde trarão mais contribuições.

Parrott & Smith (1984) analisaram a frequência de produção de pólen $2n$ em uma população diplóide de trevo vermelho. Os autores encontraram, em 3% das plantas, uma produção de, no mínimo, 1% de pólen $2n$. Estas foram consideradas produtoras de pólen não reduzido.

Na seqüência deste trabalho, três ciclos de seleção fenotípica recorrente aumentaram a frequência de produção de grãos de pólen não reduzidos nas populações analisadas. A produção de matéria seca das plantas não diminuiu com o processo de seleção, o que poderia ter ocorrido, devido à possibilidade de depressão endogâmica. Quando a produção de oosferas $2n$ também é detectada, a possibilidade de poliploidização sexual aumenta grandemente (Parrott & Smith, 1986c).

Parrott et al. (1985) identificaram três plantas diplóides produtoras de oosferas $2n$, realizando cruzamentos unilaterais $2X - 4X$. Em três cruzamentos, 20, 17 e 3% das sementes coletadas foram tetraplóides. A frequência de oosferas $2n$ calculada foi de 0,215, 0,467 e 0,157 em cada 1000 flores polinizadas, respectivamente. Em todos os cruzamentos, somente uma planta triplóide foi obtida.

No mesmo trabalho, um segundo experimento tentou obter tetraplóides através de poliploidização sexual bilateral (cruzamentos 2X-2X) sem a seleção inicial de fêmeas produtoras de oosferas não reduzidas. Foram utilizadas 14 plantas que produziram 57 sementes. Uma das plantas produziu um indivíduo tetraplóide e uma outra planta produziu dois indivíduos tetraplóides. Os autores estimaram que a frequência de produção de oosferas $2n$ foi de 3,33 (na primeira planta) e cinco (na segunda planta) em cada 1000 flores polinizadas.

Em cruzamentos bilaterais 4X-2X, Taylor & Wiseman (1987) obtiveram uma progênie híbrida composta de 33 triplóides e três tetraplóides, que evidenciaram o envolvimento de gametas masculinos não reduzidos. As 119 plantas obtidas através de autofecundação foram facilmente identificadas porque os progenitores femininos usados eram clones tetraplóides de inflorescência branca (caráter recessivo) cruzados com plantas de uma população diplóide de inflorescências vermelhas homocigota dominante para a característica.

Taylor & Berger (1989), encontraram triplóides em relativamente alta frequência e uma ampla variação de plantas tetraplóides entre progênies de cruzamentos 2X – 4X, e estimaram que foram produzidas 6,2 oosferas não reduzidas em cada 1000 flores polinizadas. Em outra direção (cruzamentos 4X – 2X), a porcentagem de plantas tetraplóides foi maior do que a porcentagem de triplóides. Os autores não descartaram a possibilidade de autofecundação, já que não foi utilizado nenhum marcador morfológico para diferenciar a progênie.

Os trabalhos relatados apresentam dados que indicam que populações tetraplóides podem ser desenvolvidas por métodos de poliploidização sexual. Se um amplo número de pais de diversas origens pode ser obtido, evitaria linhas melhoradas com estreita base genética e subsequente depressão endogâmica (Taylor & Quesenberry, 1996).

Os trabalhos acima citados foram avaliações realizadas nos Estados Unidos. Neste país, germoplasmas tetraplóides de trevo vermelho apresentaram mais baixa produção e menos persistência do que os diplóides comparados (Taylor, 1983; 1989). Por isso, as cultivares americanas de trevo vermelho são diplóides (Taylor & Smith, 1995).

Segundo Taylor (1987), pesquisas para o desenvolvimento de cultivares tetraplóides são conduzidos com maiores esforços na Europa e Nova Zelândia. Foi relatado que estas cultivares são mais persistentes, produzem mais e são mais resistentes a doenças do que plantas diplóides. Porém, o autor ressaltou que a exata comparação entre tetraplóides e diplóides não é possível. O sucesso com tetraplóides em outros países estimulam mais pesquisas na América do Norte. No Canadá, a cultivar tetraplóide Bytown (Taylor, 1987; Taylor & Smith, 1995) e na Hungria, a cultivar Hungaropoly (Taylor & Smith, 1995) são citadas na literatura. Helgadóttir et al. (2000) citaram algumas cultivares tetraplóides desenvolvidas para a região norte da Europa: Kolpo, Syn, Teps, Sv Betty e Sv A90052.

A cultivar Bytown foi a primeira cultivar tetraplóide de trevo vermelho, lançada no Canadá em 1979, sendo desenvolvida para tolerância à podridão da raiz causada pelo fungo *Sclerotinia trifoliorum* (Maddil & Skepasts, 2003).

Christie & Choo (1991) avaliaram a tolerância ao frio das cultivares tetraplóides Hungaropoly e Tapiopoly. Ambas são recomendadas para produção de forragem. Os autores observaram uma associação positiva entre as plantas com hábito de crescimento mais vegetativo (tipos que não floresceram) com subsequente sobrevivência.

Em 1990, no Japão, foi registrada uma cultivar diplóide (Hokuseki) e uma tetraplóide (Taisetsu). Estas foram comparadas quanto à persistência com a cultivar de origem Sapporo. As duas cultivares novas foram mais persistentes que a Sapporo, pois produziram mais matéria seca a partir do terceiro ano, em cinco anos de avaliações. Também foram mais tolerantes ao fungo *Sclerotinia trifoliorum*, o que contribuiu para a persistência superior das novas cultivares (Yamaguchi et al., 1993).

Taylor et al. (2000) registraram a cultivar tetraplóide “99-L38-1799”, que foi lançada pelo Kentucky Agricultural Experimental Station em 1998. Esta cultivar é derivada da cultivar tetraplóide suíça Témara. Este é o primeiro material tetraplóide registrado que apresenta um marcador genético associado, podendo ser útil para proteção da cultivar e auxílio nas investigações genéticas em nível tetraplóide.

A razão pela qual os tetraplóides têm tido sucesso na Europa e não nos Estados Unidos não está relacionada com o método de produção dos tetraplóides. Uma sugestão é que não seriam adaptados para as condições de estresse que prevalecem nos Estados Unidos. Isto não concorda com os dados de Makarov (1983, apud Taylor & Quesenberry, 1996), que encontrou mais alta produção de matéria seca em tetraplóides do que em diplóides quando

populações foram cultivadas em condições de seca. Melhoristas da Europa têm envolvido tetraplóides há mais tempo nos programas do que os Estados Unidos e, tempo aparentemente considerável é necessário para os genes de trevo vermelho se tornarem adaptados para permanecer em células do mais alto nível de ploidia (Taylor & Quesenberry, 1996). Portanto, o tempo de desenvolvimento de projetos com trevo vermelho tetraplóide poderia explicar as diferenças de sucesso entre Europa e Estados Unidos. Ainda assim, esforços foram feitos para duplicar o complemento cromossômico de materiais adaptados nos Estados Unidos, por colchicina, óxido nitroso e gametas não reduzidos (Taylor, 1987).

Taylor & Smith (1995) comentaram sobre a importância de desenvolver cultivares próprias para cada região: os autores disseram que a maioria das cultivares são específicas para determinadas áreas onde foram desenvolvidas. Por exemplo, uma rede de avaliação de trevo vermelho, chamada “Nordclover” foi criada em áreas nórdicas (Islândia, Noruega, Dinamarca, Suécia e Finlândia) da Europa. Lá, são realizados trabalhos de “pré-melhoramento”, avaliação e desenvolvimento de genótipos que tenham alta tolerância às condições ambientais extremas de frio e variabilidade suficiente para seleção de características de interesse agrônomo (Helgadóttir et al., 2000).

2. 2.1.5. Efeitos negativos da poliploidia

Autopoliplóides e alopólíplóides recém formados apresentam um complicado padrão de pareamento meiótico. Normalmente, os alopólíplóides

exibem uma segregação dissômica, formando bivalentes durante a meiose. Porém, nos autopoliplóides, os conjuntos de cromossomos homólogos podem parear ao acaso, com tendência a formar multivalentes na meiose (Hertzsch, 1960; De Wet, 1971; Stebbins, 1971; Ramsey & Schemske, 2002). A segregação tetrassômica verificada nos autopoliplóides conduz ao declínio da fertilidade devido à possibilidade de formação de gametas não balanceados (Hertzsch, 1960; Otto & Whitton, 2000).

Com fertilidade em geral mais baixa, os autopoliplóides produzem menos sementes (Levan, 1939; Stebbins, 1971; Hertzsch, 1960; Dewey, 1980), dificultando os cruzamentos neste nível. Portanto, melhoramento de cereais, plantas produtoras de óleo e outras que necessitem de sementes, utilizando poliplóides, se torna mais difícil. O crescimento dos poliplóides é mais lento, devido ao mais lento ritmo mitótico. Por isso, variedades duplicadas podem crescer e produzir mais no final das estações. Essas considerações indicam que novos autopoliplóides podem ser promissores em plantas forrageiras e capacitam a utilização de muitas formas gigantes (Hermsen, 1984b).

Levan (1939) salientou que a diminuição na quantidade de sementes nas formas tetraplóides de *Trifolium* pode ser uma dificuldade crucial. O inadequado conjunto de sementes de trevo vermelho tetraplóide é a maior limitação para sua ampla exploração comercial.

Stebbins (1947) citou três causas que levam plantas autotetraplóides à esterilidade: 1º) distribuição irregular dos cromossomos causada por separação desigual dos multivalentes; 2º) distribuição irregular dos cromossomos causada por irregularidade meióticas, de natureza fisiológica,

provavelmente sob controle genético; 3º) esterilidade genética-fisiológica, de natureza não explicada, mas não associada com irregularidades meióticas.

Mais recentemente, Ramsey & Schemske (2002) afirmaram que não foram encontradas evidências de que a fertilidade dos autopoliplóides seja menor que dos aloploiplóides, já que a ocorrência de associações bivalentes é freqüente durante o pareamento cromossômico na meiose. Com isso, os autores mostraram que a regularização do pareamento é um processo bastante rápido.

Alguns estudos citológicos demonstraram que associações bivalentes predominam em formas tetraplóides oriundas de poliploidizações no gênero *Trifolium*.

Schifino & Moraes Fernandes (1986; 1987), ao analisarem o comportamento meiótico de plantas de *Trifolium riograndense* poliploidizadas com colchicina, constataram a prevalência de associações bivalentes e baixo número de quadrivalentes, trivalentes e univalentes, sugerindo um controle genético para o pareamento cromossômico. Houve uma correlação positiva entre índice meiótico, fertilidade do pólen e produção de sementes.

Souza et al. (1988) verificaram altas quantidades de sementes em *Trifolium riograndense* tetraplóide. Estes resultados indicaram que, em autotetraplóides de *T. riograndense*, a fertilidade não foi reduzida e algumas vezes foi equivalente aos diplóides.

Em híbridos tetraplóides de progênie originada de cruzamentos 4X – 2X em trevo vermelho, plantas triplóides apresentaram 4,34 associações trivalentes, 2,7 bivalentes e 2,58 univalentes. Já nos tetraplóides produzidos

através de gametas não reduzidos, muitas associações foram de quadrivalentes (2,33), mas a maioria das configurações meióticas foi de bivalentes (8,05) e 88% dos grãos de pólen avaliados foram estáveis (Taylor & Wiseman, 1987).

Tofte & Smith (1989) examinaram citologicamente plantas tetraplóides sexuais de trevo vermelho derivadas de cruzamentos bilaterais. A maioria das associações cromossômicas, tanto de indivíduos euplóides ($2n=4x=28$) quanto aneuplóides ($2n=25,26,27,30$), foi de bivalentes. Uma planta com 25 cromossomos teve menor frequência de bivalentes (4,1) e duas plantas com 30 cromossomos tiveram mais bivalentes (7,75) dentre as analisadas.

2.3. Método de seleção para trevo vermelho

O uso de gametas não reduzidos para multiplicar o complemento cromossômico em trevo vermelho oferece uma possibilidade para mais facilmente incorporar materiais adicionais dentro de cultivares tetraplóides, devido ao aumento da base genética (Taylor & Giri, 1983).

Porém, algumas características desejáveis, como altas frequências de produção de gametas não reduzidos, não aparecem logo na primeira geração em uma população. Algum método de seleção deve ser usado para aumentar a frequência dos genes da característica e revelar sua variação (Taylor & Quesenberry, 1996). Mesmo depois de obtidas as plantas poliplóides, é necessário que a duplicação cromossômica seja seguida por um tipo de

seleção recorrente que permita a formação de combinações ótimas de genes em nível tetraplóide (Taylor, 1987).

Para o desenvolvimento de trevo vermelho tetraplóide, uma relativamente alta frequência de produção de gametas $2n$ em populações diplóides torna-se necessária. Plantas selecionadas podem ser intercruzadas para desenvolver uma nova população para testes e/ou seleção. A repetição continuada deste processo, chamada de seleção fenotípica recorrente, mantêm os melhores materiais para a próxima geração ou ciclo de seleção (Taylor & Smith, 1979; Parrott & Smith, 1984).

O método de seleção fenotípica recorrente é muito utilizado para selecionar várias características desejáveis em trevo vermelho (Taylor & Smith, 1979). Taylor (1987) e Paim (1994) salientaram que este método de seleção é efetivo para características de herança simples e de alta herdabilidade e que são facilmente identificadas e reconhecidas (resistência a doenças, conteúdo de tanino, tamanho de sementes).

Malm & Hittle (1963) observaram que este método de seleção foi eficiente para melhorar a persistência de trevo vermelho e ainda manter a espécie com características desejáveis. Os autores conseguiram, em três ciclos de seleção fenotípica recorrente, plantas superiores para persistência, hábito de crescimento e vigor.

Mokhtarzadeh et al. (1967) selecionaram linhas maternas e realizaram seleção fenotípica com a finalidade de aumentar a persistência em trevo vermelho. No terceiro ciclo, o objetivo foi alcançado. Os autores observaram que o aumento da persistência diminuiu a produção de forragem

no primeiro ano, mas aumentou no segundo ano, concluindo ser eficiente este método de seleção.

Taylor et al. (1985) verificaram que a seleção fenotípica recorrente foi eficiente para selecionar plantas com inflorescências de múltiplos capítulos. Foram necessárias seis gerações de seleção para aumentar linearmente o número de inflorescências de um para 7,4. Os autores concluíram que este tipo de seleção é eficiente em produzir genótipos extremos, sugerindo que muitas características podem ser desenvolvidas dentro de variedades locais adaptadas. O maior problema, segundo os autores, é a dificuldade de mudar uma característica morfológica sem mudar outras características indesejáveis. A seleção contra pode ser difícil, ou até impossível em certos programas.

Broda et al. (1991) testaram o efeito da seleção fenotípica recorrente para produção de sementes em uma população de trevo vermelho obtida através de cruzamentos 2X – 4X. A produção de sementes aumentou de 36,7-43,7 na geração F1 para 71-85% nas gerações F8 e F10.

Em programas de melhoramento com trevo vermelho, ciclos de seleção recorrente para produção de pólen $2n$ foram usados com sucesso (Taylor & Smith, 1979; Parrott & Smith, 1986c), e mostraram ser eficientes também em outras culturas, como alfafa (Tavoletti et al., 1991a; 1991b).

Parrott & Smith (1986c) utilizaram ciclos de seleção fenotípica recorrente para aumentar a média de produção de pólen $2n$ em populações selecionadas de trevo vermelho. Em três ciclos de seleção, a produção de gametas $2n$ aumentou de 0,04%, na população original, até 47,38% no terceiro ciclo de seleção, com herdabilidade estimada para a produção de pólen $2n$ de

0,50. Os autores concluíram que este método de seleção é efetivo para aumentar a frequência de produção de pólen $2n$ em trevo vermelho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas deste trabalho, envolvendo estabelecimento das plantas, avaliações, seleção, cruzamentos e coleta de sementes foram realizados nas dependências (casa de vegetação e Laboratórios de Citogenética e Microscopia Óptica) do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia (UFRGS).

O trabalho realizado foi conduzido em dois experimentos, identificados como Experimento 1 (Exp. 1) e Experimento 2 (Exp. 2).

3.1. Experimento 1

Este experimento teve início em abril de 2000 e término em janeiro de 2004.

3.1.1. Semeadura

Em abril de 2000, sementes de trevo vermelho da cultivar Quiñiqueli (encontradas no comércio) foram inoculadas com *Rhizobium* específico para *Trifolium* e peletizadas com carbonato de cálcio.

Após a inoculação, cerca de 3000 sementes foram postas para germinar em placas de petri previamente desinfectadas com álcool etílico,

fornadas com papel filtro e mantidas úmidas para estimular o processo germinativo.

3.1.2. Transplante para vasos

As plântulas nas quais emergiram cotilédones foram transferidas para sementeiras e, após o surgimento da primeira folha unifoliolada, foram transferidas para copos de plástico (com capacidade de 500ml) com terra, com identificação (nº 1 até n). Estes vasos foram mantidos em casa de vegetação com fornecimento de luz artificial através de lâmpadas fluorescentes e incandescentes, totalizando um fotoperíodo de 16 horas, com o objetivo de induzir as plantas ao florescimento. Cerca de 500 plantas efetivamente cresceram e as que floresceram foram avaliadas como descrito a seguir.

3.1.3. Determinações do experimento

3.1.3.1. Análise de grãos de pólen para identificação de plantas produtoras de pólen 2n

Uma diferença que distingue o trevo vermelho diplóide do tetraplóide é a forma e o tamanho do grão de pólen maduro. Tais diferenças servem para uma rápida triagem de plantas para indução de tetraploidia (Taylor et al., 1976) ou identificação de plantas produtoras de gametas 2n (Parrott & Smith, 1984). Neste trabalho, a detecção de grãos gigantes serviu para a seleção de plantas produtoras de grãos de pólen gigantes e como um indicativo de que estes

poderiam ser não reduzidos. Em laboratório, foi verificada a frequência de aparecimento de grãos gigantes nas amostras coletadas.

Quando maduras, algumas flores foram retiradas ao acaso das inflorescências para serem analisadas imediatamente ou, havendo necessidade, uma inflorescência de cada planta foi coletada e fixada em fixador Carnoy 3:1 (álcool etílico: ácido acético) durante aproximadamente 24 horas, à temperatura ambiente. Decorrido este período, o material foi estocado em álcool etílico 70% e mantido sob refrigeração para análises posteriores.

Para a preparação das lâminas, as anteras de três flores de uma mesma inflorescência foram dissecadas (sob observação em lupa) separadamente por planta. Após, sobre a lâmina, essas foram maceradas, coradas com carmim propiônico e cobertas com lamínula. A análise foi realizada em microscópio óptico comum, em um aumento de 200X.

No total, três lâminas por planta foram preparadas. Em cada lâmina, foram observados cerca de 500 grãos. Destes, cinco grãos normais por lâmina foram medidos, em micrômetros (μm), para efeitos de comparação com os grãos de tamanho maior. Esta medida foi feita com o auxílio de uma régua micrométrica que ficava acoplada à ocular do microscópio. Para a medição, tomou-se o tamanho do diâmetro de dois eixos imaginários, citados como eixo maior e eixo menor, ou mais especificamente, comprimento e largura do grão de pólen, uma vez que a forma dos grãos normalmente não é redonda.

Durante o rastreamento, quando apareceram grãos maiores do que os normais, estes eram registrados e alguns deles também eram medidos. No total, 1500 grãos de pólen por planta foram avaliados. Não houve uma definição absoluta entre grãos normais e gigantes, apenas uma aparente

demarcação, que possivelmente poderia diferenciar o tamanho dos grãos. Grãos considerados normais foram os que apresentaram no, máximo, 55,9 μm de comprimento e 53,75 μm de largura. Evans (1955) escolheu uma medida mínima para os grãos gigantes. Neste experimento, grãos considerados gigantes foram os que apresentaram medidas mínimas de 58,5 μm (comprimento) e 55,9 μm (largura), na maioria das investigações.

As plantas que apresentaram no mínimo 15 grãos gigantes, ou seja, 1% do total analisado, como sugerido em Parrott & Smith (1984), foram selecionadas para posterior realização de cruzamentos. As plantas em que não foram verificadas anormalidades na produção de grãos de pólen, ou seja, apresentaram menos de 1% de grãos gigantes, foram descartadas após cada análise.

3.1.3.2. Poliplóides importados

Sementes produzidas em cruzamentos 2X-4X e 4X-2X, desenvolvidas na Universidade de Kentucky, Lexington, Estados Unidos, foram enviados pelo Dr. Norman Taylor em 2000 para serem utilizadas neste experimento. Os tetraplóides deste material foram obtidos através de poliploidização com óxido nítrico pelo referido pesquisador e os genitores diplóides foram selecionados por produzirem grãos de pólen de tamanho gigante. Inicialmente, 200 sementes deste material foram peletizadas, postas a germinar e transferidas para vasos com terra, idem ao citado nos itens 3.1.1 e 3.1.2. A determinação do número cromossômico foi realizada em todos os indivíduos adultos. As plantas que floresceram foram analisadas quanto ao

tamanho de grãos de pólen. A denominação das plantas ficou assim estabelecida: plantas T1-1, T1-2,...,T1-n: vindas dos cruzamentos 4X-2X e plantas T2-1, T2-2,..., T2-n vindas dos cruzamentos 2X-4X.

3.1.3.2.1. Análises de grãos de pólen

O procedimento de preparação das lâminas e o método para medir os grãos de pólen foram os mesmos dos citados no item 3.1.3.1. Neste caso, porém, foram feitas medidas em 10 grãos de pólen por lâmina preparada para cada planta. No total, 30 grãos foram medidos e, no final, uma média da medida dos grãos por planta foi obtida para que fosse feita uma comparação entre o tamanho destes grãos com aqueles grãos gigantes encontrados nas plantas diplóides selecionadas. Esta comparação foi efetuada para verificar se, de fato, as plantas diplóides deste trabalho, que foram consideradas possivelmente produtoras de gametas não reduzidos, apresentavam tamanhos de grãos de pólen gigantes pelo menos semelhantes ao dos grãos das plantas poliplóides do Dr. Taylor.

3.1.3.2.2. Determinação do número cromossômico

Para confirmar a condição tetraplóide das plantas obtidas das sementes importadas, pontas de raiz foram removidas das plantas adultas mantidas em casa de vegetação, pré-tratadas com uma solução saturada de paradiclorobenzeno (PDB) e mantidas sob refrigeração por cerca de 18 à 20h. Decorrido este período, as pontas foram fixadas por 24h em uma solução 3:1 (álcool etílico: ácido acético) e depois estocadas em álcool etílico 70% sob refrigeração até que se procedessem as análises.

Para as análises, as pontas foram hidrolisadas em HCl 1N (ácido clorídrico um normal), permanecendo por cerca de cinco minutos à 60°C. Para coloração das pontas de raiz, estas ficaram ao abrigo da luz mergulhadas em corante Feulgen por um período de duas a quatro horas, aproximadamente (metodologia descrita por Cardoso et al., 2000). A preparação das lâminas foi realizada sob lupa, com a extração da ponta da raiz corada, maceração, aplicação de carmim propiônico e cobertura por uma lamínula para visualização sob microscópio óptico, em um aumento de 1000X. A contagem cromossômica foi feita em células intactas com cromossomos bem espalhados em pró-metáfase ou metáfase. No mínimo, dez células foram avaliadas para cada planta examinada. Anormalidades ocorrentes também foram registradas.

As plantas nas quais foi confirmada a duplicação cromossômica, foram utilizadas como genitores femininos em cruzamentos unilaterais que envolveram as plantas diplóides selecionadas como doadoras de pólen.

3.1.3.3. Cruzamentos e ciclos de seleção

Após a primeira etapa das análises, as plantas que foram selecionadas para a realização dos cruzamentos. Inicialmente, as plantas diplóides selecionadas foram isoladas das demais para serem polinizadas por insetos. Porém, não houve presença de polinizadores no local em que as plantas estavam e, conseqüentemente, não houve polinização e produção de sementes. Foi necessário, então, que se partisse para o processo de polinizações manuais. As plantas ficaram alguns meses (de dezembro/2000 a janeiro/2001) sem produzir sementes (à espera de polinizadores naturais) e,

quando se decidiu realizar polinizações manuais, muitos indivíduos selecionados haviam morrido, devido ao calor intenso, e o florescimento havia sofrido uma queda acentuada. Por isso, as plantas restantes foram utilizadas como genitoras masculinas (doadoras de pólen) nas polinizações manuais e os poliplóides importados serviram de genitores femininos, pois estavam bem estabelecidos e em pleno florescimento (cruzamentos unilaterais na direção 4X – 2X).

O procedimento de polinização manual seguiu àquele sugerido por Taylor & Smith (1979) e Taylor (1980, 1987). Para exposição do estigma das flores, foi necessário o uso de um pequeno palito de madeira com ponta fina. Com uma quilha feita de papel firme, foi retirado o pólen dos doadores e colocado nas flores dos genitores femininos. A Figura 1 ilustra o procedimento adotado nas polinizações manuais.

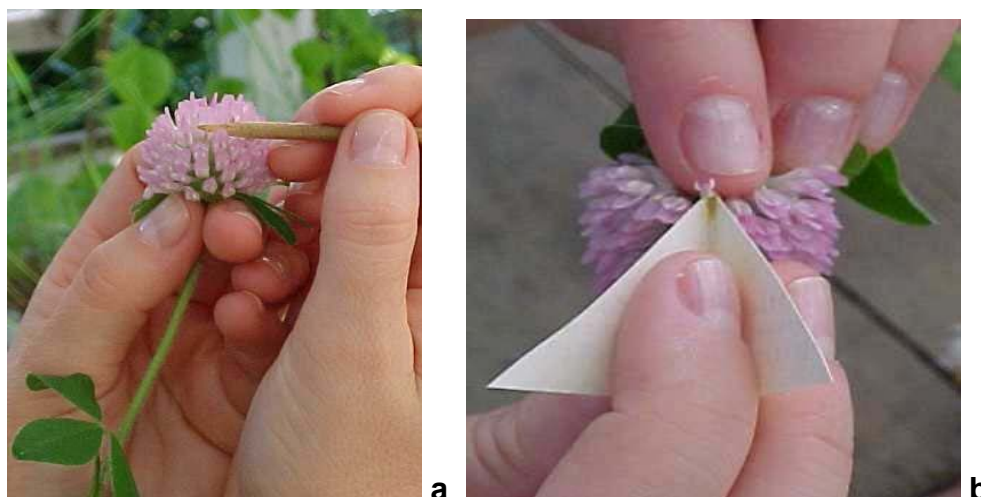


FIGURA 1 – Ilustração do procedimento utilizado para realizar as polinizações manuais: a) exposição do estigma no genitor feminino; b) coleta de pólen no genitor masculino (Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2000).

As informações referentes às polinizações foram anotadas: número correspondente da planta polinizada e das doadoras de pólen, número de flores polinizadas, número de sementes produzidas em cada inflorescência.

Após a efetivação dos cruzamentos, esperou-se no mínimo 21 dias antes da coleta das sementes, já que este é o período recomendado por Taylor & Smith (1979). Uma vez coletadas, estas foram mantidas separadas e identificadas para o próximo ciclo de seleção.

3.1.3.4. Análises gerais das progênies

Neste Experimento 1, foram realizadas análises gerais de todos os indivíduos que alcançaram a fase adulta, resultantes dos cruzamentos realizados durante os quatro ciclos em que o trabalho foi conduzido.

As análises foram em relação às condições reprodutivas (níveis de ploidia, viabilidade dos grãos de pólen e produção de sementes) e à persistência das progênies. Também foi verificada a possibilidade do uso de plantas triploides como uma ponte para a formação dos tetraploides.

A análise da viabilidade dos grãos de pólen é uma maneira de estimar as condições reprodutivas em que a progênie se apresenta no decorrer das gerações. O método de preparação de lâminas para essas análises foi idêntico ao exposto no item 3.1.3.1. Neste caso, em cada lâmina, também se analisou 500 grãos, mas estes foram classificados entre cheios de tamanho normal e cheios de tamanho gigante (considerados férteis) e grãos inviáveis (vazios, parcialmente cheios, micropólens cheios, parcialmente cheios e

vazios). A ocorrência de cada um dos tipos de grãos foi expressa em porcentagem. Este procedimento foi repetido em todas as gerações avaliadas.

A contagem do número cromossômico em células mitóticas de pontas de raiz das plantas para deduzir sobre o nível de ploidia seguiu a mesma metodologia explanada no item 3.1.3.2.2. Este procedimento foi adotado em todas as plantas de todos os ciclos deste experimento.

Observações quanto à persistência, hábito de crescimento e vigor foram constantemente avaliados em todas as etapas do trabalho.

3.2. Experimento 2

Este experimento iniciou em junho de 2001 e estendeu-se até dezembro de 2003.

Inicialmente, três cultivares foram utilizadas para a realização das análises: Quiñiqueli, Keenland e Redland. Estas duas últimas foram enviadas pelo Dr. Julio Viegas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em 2001. Todo o procedimento de semeadura, transplante para vasos, cuidados culturais até o florescimento e análises de grãos de pólen, seleção e cruzamentos foram feitos como as avaliações do Experimento 1.

Neste segundo experimento foi possível realizar os ciclos de seleção fenotípica recorrente, já que aqui os cruzamentos foram bilaterais (2X – 2X), envolvendo somente o nível diplóide. As plantas adultas em cada nova geração foram avaliadas para produção de grãos de pólen gigantes e os cruzamentos recíprocos manuais ocorreram entre as plantas selecionadas.

A cada novo ciclo, foram realizados os seguintes procedimentos: (1) verificação da frequência de surgimento de grãos de pólen gigantes em cada planta individualmente; (2) medidas de uma amostra de 15 grãos normais e de, no mínimo, 15 grãos gigantes por planta; (3) seleção das plantas com mais alta produção de grãos maiores; (4) cruzamentos manuais entre os indivíduos selecionados; (5) produção de sementes; (6) germinação das sementes coletadas e estabelecimento de plântulas para o novo ciclo.

Neste experimento, a partir do segundo ciclo de avaliações, procedeu-se não só a identificação de grãos gigantes e suas respectivas medidas, mas também se verificou a viabilidade dos grãos de pólen das plantas, como consta no item 3.1.3.4.

No primeiro ciclo, foram selecionadas as plantas que produziram no mínimo 1% de grãos de pólen gigantes (segundo a referência de Parrott & Smith, 1984); no segundo ciclo, plantas com produção de no mínimo 2% de macropólen foram selecionadas e no terceiro ciclo, plantas com no mínimo 3% de grãos maiores foram selecionadas. No último ciclo, as plantas com as mais altas porcentagens de grãos gigantes foram submetidas a análises de pontas de raiz para verificar se alguma progênie triploide, tetraploide ou algum aneuploide havia surgido nesta descendência. A metodologia para estas análises é a mesma descrita no item 3.1.3.2.2.

3.3. Análises dos dados

3.3.1. Experimento 1

No primeiro ciclo, a análise dos dados foi principalmente descritiva, já que neste houve um só tratamento, tanto na população diplóide (cultivar Quiñiqueli) quanto na população tetraplóide analisada. Como cada planta individual não possuía repetição, não foi possível realizar análises de variância para porcentagem de produção e porcentagem de aumento de grãos de pólen gigantes. Neste caso, a variabilidade individual foi considerada variação intrínseca ou erro aleatório. Foi possível fazer tabelas com médias e amplitudes de variação de cada planta individualmente para a variável tamanho dos grãos de pólen.

Ganhos de seleção e diferencial de seleção para frequência de surgimento de grãos de pólen gigantes foram feitos nas plantas da cultivar Quiñiqueli, comparando a população original avaliada, sem seleção prévia, com a população selecionada. As fórmulas utilizadas para realizar estes cálculos foram:

DS (diferencial de seleção) = média da população melhorada – média da população original.

GS (ganho de seleção) (%) = $DS \times 100 / \text{média da população original}$

No terceiro ciclo, devido ao baixo número de plantas obtidas, também só foi possível realizar uma análise descritiva.

Nos ciclos dois e quatro, o delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado e as famílias compostas dos meio-irmãos de cada planta mãe do ciclo anterior foram consideradas tratamentos. Então, as repetições foram as plantas irmãs dentro das famílias. Foram realizadas análises de variância para porcentagem de produção de grãos de pólen normais, gigantes e inviáveis. O teste F realizado não mostrou diferença

significativa para nenhuma das variáveis, a um nível de significância de 5%. Estas análises foram realizadas com o programa de análises genéticas GENES (Cruz, 2001).

Na Figura 2 está representado o esquema dos cruzamentos realizados durante os quatro ciclos deste Experimento 1.

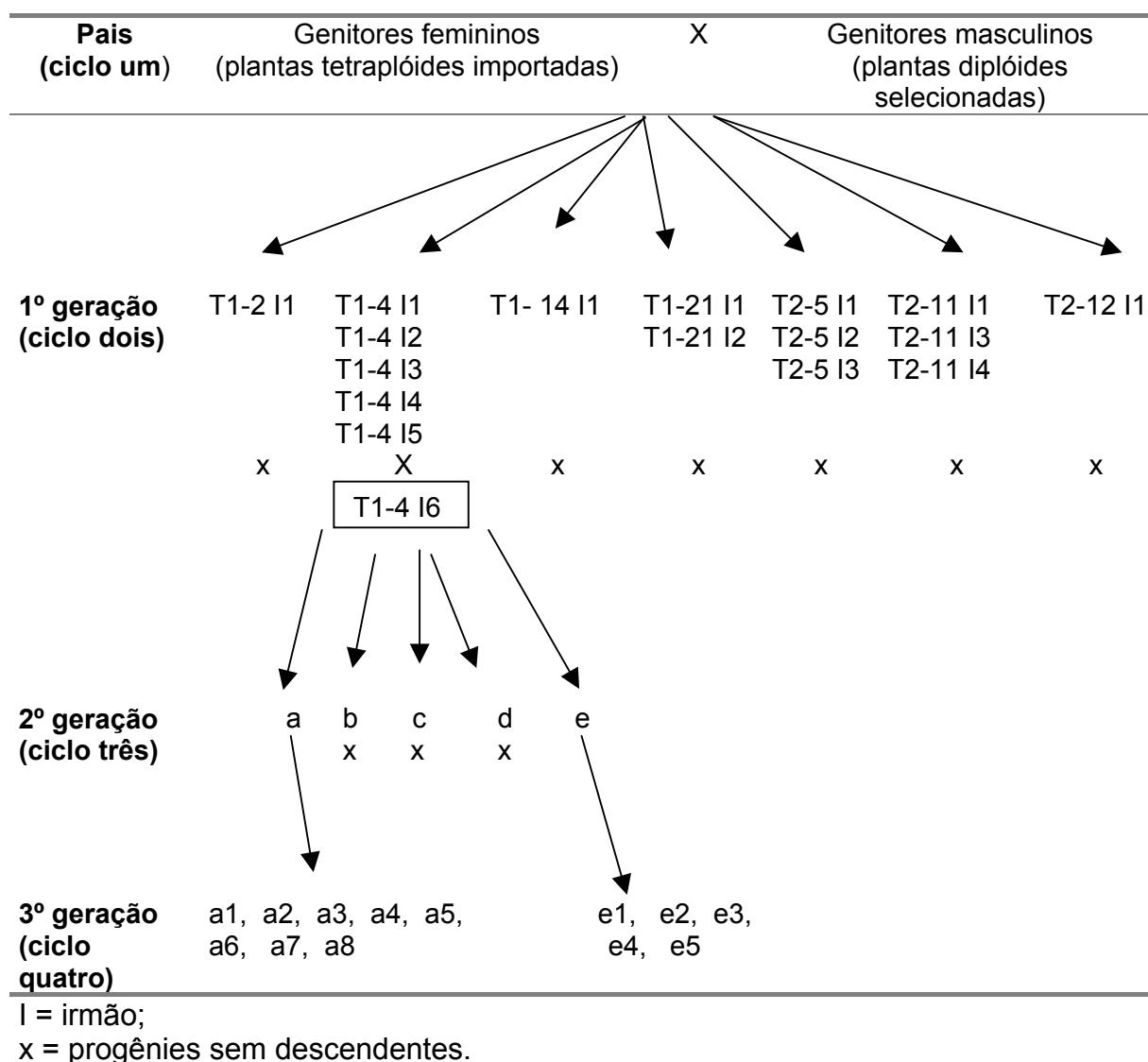


FIGURA 2 – Esquema dos cruzamentos realizados nos quatro ciclos de seleção do Experimento 1.

3.3.2. Experimento 2

O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado com número variável de repetições. No primeiro ciclo, cada cultivar utilizada foi considerada um tratamento (Quiñiqueli, Redland e Keenland), e cada planta selecionada, dentro das cultivares, foi considerada como uma repetição. As variáveis comparadas pelo teste F a um nível de significância de 5% foram: porcentagem de aumento dos grãos gigantes e porcentagem de ocorrência de grãos gigantes. A variável porcentagem de aumento dos grãos gigantes foi analisada considerando-se somente a medida do comprimento dos grãos. Essas análises foram realizadas com o programa GENES (Cruz, 2001). Um teste T-student, a um nível de significância de 5%, foi realizado para verificar se a proporção de aumento dos grãos gigantes era de, no mínimo, 30% em relação aos grãos normais, o que indicaria que eram de fato não reduzidos, como consta nos dados da literatura. Para esta avaliação, foi realizada uma medida de área dos grãos de pólen, já que estas possuem forma elíptica, utilizando a seguinte fórmula:

$$A = (\pi \times a \times b) / 4,$$

onde *a* representa a medida do comprimento dos grãos e *b* representa a medida da largura dos grãos. Esta análise foi realizada no software SAS versão 8.2 e SPSS versão 8.0.

No ciclo dois, foram realizadas as mesmas análises do ciclo um, os mesmos procedimentos e os mesmos pacotes estatísticos. Nesta geração, foram avaliadas as filhas das plantas selecionadas de cada cultivar do ciclo anterior, por isso aumentou o número de tratamentos. As famílias de meio

irmãos foram identificadas por letras e cada planta selecionada dentro das famílias, foi considerada uma repetição. Por exemplo, as plantas descendentes da família Q178, que foi uma das plantas selecionadas no primeiro ciclo, foram classificadas como tratamento “Q”; as plantas vindas das mães R4 do primeiro ciclo, foram inseridas no tratamento “B”; as plantas originadas da mãe K88, pertenceram à família “H”, e assim por diante. No total, 12 tratamentos foram avaliados. Quando houve diferença significativa pelo teste F para as variáveis porcentagem de aumento dos grãos gigantes ou porcentagem de grãos gigantes, o teste de Tukey a 5% de significância foi aplicado para as comparações entre as médias das famílias.

No ciclo três, as mesmas variáveis do ciclo dois foram avaliadas e os tratamentos foram definidos de acordo com as plantas mãe selecionadas que derivaram as sementes no ciclo anterior. Por exemplo, da descendência da família “E” do ciclo dois, três plantas, identificadas como E48, E50 e E55 foram selecionadas e originaram três famílias no último ciclo. Foi considerada repetição cada planta irmã dentro de cada família. No total, foram avaliados 18 tratamentos neste ciclo.

A viabilidade do pólen e a porcentagem de flores polinizadas que produziram sementes em cada família foram analisadas descritivamente nos três ciclos de seleção.

Os cálculos de ganhos de seleção e diferencial de seleção para frequência de surgimento de grãos de pólen não reduzidos foram realizados primeiramente nos três ciclos, em avaliações independentes por ciclo. Esta verificação comparou o desempenho geral das famílias em cada ciclo de

seleção quanto à capacidade de produzir grãos de pólen gigantes. A análise considerou, em todas as gerações, todas as plantas descendentes, como repetições, dentro das três cultivares. Então, para estes cálculos, houve sempre três tratamentos, Q, R e K, referentes às cultivares Quiñiqueli, Redland e Keenland, respectivamente. Esta análise teve por objetivo verificar a eficiência do processo seletivo utilizado em cada ciclo de seleção. A média geral de ocorrência de grãos gigantes nas populações originais de cada ciclo (todas as plantas avaliadas dentro de cada cultivar) foi confrontada com a média de ocorrência nas populações selecionadas.

Com a utilização do programa estatístico SANEST, foi realizada uma análise de variância para comparar a capacidade geral de cada família em produzir grãos de pólen gigantes. Também foram feitas análises desta variável para o progresso feito pelas famílias nos ciclos de seleção e para o progresso geral das populações selecionadas neste experimento nos três ciclos de seleção. Esta variável foi analisada com valores médios (das famílias ou dos ciclos) de porcentagem de produção de grãos de pólen gigantes, e foi mantida a estrutura original das três famílias, composta pelas cultivares Quiñiqueli, Redland e Keenland. A comparação destas médias foi feita pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

Também foram realizados cálculos de diferencial de seleção e ganhos de seleção comparando as médias de produção de gametas gigantes na população original do primeiro ciclo, envolvendo a média das três cultivares, com a média final de produção do último ciclo de seleção, onde foi tomada a média de produção da população selecionada.

Convém salientar que, embora a estrutura familiar tenha sido mantida durante a seleção, as famílias contribuíram com uma progênie de diferentes números para as gerações seguintes. Isto acarretou em dificuldades para analisar e concluir sobre os resultados. Uma particularidade das análises feitas com o programa estatístico SANEST deve ser mencionada. Para realizar a análise de variância, este programa diluiu as médias dos tratamentos (no caso, cultivares) utilizando, para isso, valores de todos os ciclos, com a finalidade de balancear o número de repetições e assim, poder conduzir as análises. Por isso, as médias de frequência de produção obtidas com este programa diferem das médias obtidas para os cálculos de diferencial de seleção e ganhos de seleção que foram discutidos em cada ciclo individualmente e que foram feitos manualmente, respeitando o número real de plantas existentes em cada família.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Considerações sobre a implantação e condução do experimento

Após as plântulas terem sido transferidas para os copos com terra em casa de vegetação, tanto no Experimento 1 quanto no Experimento 2, em todos os ciclos avaliados, observou-se uma baixa no número total de indivíduos transplantados, decorrente da dificuldade de estabelecimento das plântulas. Como resultado, o número final de plantas adultas que entraram em fase de florescimento para serem avaliadas foi muito abaixo do número inicial de sementes postas a germinar. Um fator observado que atuou com grande intensidade no estabelecimento das plântulas foi as altas temperaturas ocorrentes nos meses iniciais de cada ano, quando cada novo ciclo era estabelecido. Isto limitou o crescimento inicial e o estabelecimento de muitas plantas. Para contornar este problema, no último ano (quarto ciclo do Experimento 1 e terceiro ciclo do Experimento 2), as sementes coletadas do ciclo anterior foram postas para germinar no início do outono, em meados de abril de 2003.

4.2. Experimento 1

4.2.1. Testes de germinação

Testes de germinação foram realizados no início do trabalho, em uma amostra das sementes que foram submetidas às avaliações. O teste verificou que, a uma temperatura de 20°C, a germinação das sementes foi superior a 70%, com os cotilédones ainda fechados, quatro dias depois de terem sido postas a germinar.

4.2.2. Primeiro ciclo de seleção

4.2.2.1. Análises dos grãos de pólen e seleção de plantas diplóides

As plantas diplóides da cultivar Quiñiqueli estabelecidas em casa de vegetação e que floresceram foram avaliadas nesta primeira etapa. A Figura 3 ilustra a visão geral das plantas adultas em casa de vegetação, detalhes das inflorescências e uma inflorescência de trevo vermelho em destaque.

Quanto ao tamanho das amostras coletadas para as análises de grãos de pólen neste experimento, este foi considerado suficiente para realizar as avaliações depois de analisar alguns trabalhos anteriores. As avaliações de grãos de pólen em experimentos de trevo vermelho consultadas foram as seguintes: Giri et al. (1983) mediram a viabilidade de pólen corado em 500 grãos de pólen por planta. Parrott & Smith (1984) detectaram a produção de grãos não reduzidos em 1000 grãos por planta em 600 plantas avaliadas. O exame de 250 grãos foi usado para detectar plantas com altas freqüências de produção de grãos $2n$ por Parrott & Smith (1986c). Taylor & Wiseman (1987)



a



b



c

FIGURA 3 – a) aspecto geral da casa de vegetação com as plantas da população diplóide estabelecidas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 1); b) aspecto das inflorescências de trevo vermelho; c) inflorescência de trevo vermelho visto em detalhe (Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2000).

observaram 500 grãos de pólen nas plantas obtidas de cruzamentos 4X – 2X. Mousset-Déclas et al. (1992) avaliaram a frequência de gametas $2n$ em trevo vermelho observando a morfologia dos grãos de pólen “secos” (sem a utilização de corantes) em amostras de 300 grãos de cada uma das três inflorescências por planta.

A média geral de grãos gigantes na população original das 226 plantas analisadas foi de 0,59%, com variação de 0% até 9,07%. Em 57 plantas, não foram observados grãos maiores nas amostras avaliadas e, em 124 plantas, houve produção de menos de 1% de pólen gigante. Em 45 plantas (representando 19,91% do total de plantas avaliadas), a produção média de pólen gigante foi de 2,02%, variando de 1% a 9,07% (Tabela 1). Estas plantas foram selecionadas para a realização dos cruzamentos.

No cálculo de diferencial de seleção, houve um aumento na frequência de produção de grãos maiores de 1,43% na população selecionada sobre a população original. Isto representou um ganho de seleção realizado de 242,37%. Isto significa que, já na primeira triagem para detecção de plantas produtoras de grãos de pólen não reduzidos, foi possível obter uma população melhorada com uma alta frequência de produção de gametas gigantes.

Quanto à frequência de surgimento de pólen gigante nas plantas selecionadas, 30 plantas (66,67% do total selecionado) produziram entre um e 2% de grãos gigantes (Tabela 2). Em uma planta, número “20”, foi observada a maior frequência de surgimento de grãos gigantes entre esta população, 9,07% (Tabela 1).

TABELA 1 – Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, número e porcentagem de produção de grãos gigantes das plantas selecionadas da cultivar Quiñiqueli no primeiro ciclo (Exp. 1).

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	% aumento dos grãos gigantes**	Nº de grãos gigantes	% de grãos gigantes
3	52,30-50,74	63,14-62,65	20,71	15	1,0
8	52,60-49,88	65,29-62,88	24,11	21	1,4
18	53,16-49,02	65,72-62,14	23,61	22	1,5
20	52,03-48,30	66,28-61,64	27,40	136	9,1
34	52,95-48,26	66,11-62,07	24,85	16	1,1
36	55,18-52,17	68,39-63,66	23,92	27	1,8
48	53,75-52,76	63,18-62,57	17,56	19	1,3
83	52,17-46,58	65,33-59,83	25,21	26	1,7
87	52,03-50,09	66,07-62,75	26,98	34	2,3
100	51,60-49,17	65,76-62,09	27,45	49	3,3
102	52,74-51,88	66,65-64,50	26,37	23	1,5
109	48,87-45,58	65,53-59,49	34,09	58	3,9
118	53,58-51,06	64,50-62,35	20,38	55	3,7
136	55,08-49,17	68,24-61,79	23,89	69	4,6
149	53,97-52,46	64,73-59,14	19,96	27	1,8
151	55,38-53,41	67,94-64,17	22,67	20	1,3
161	54,76-52,98	66,28-63,86	21,04	43	2,9
171	52,31-50,46	64,97-63,86	24,21	20	1,3
184	53,97-51,17	65,79-62,14	21,91	24	1,6
202	50,74-47,02	63,43-60,20	25,00	22	1,5
211	51,82-50,31	63,36-61,21	22,28	30	2,0
234	52,31-49,02	66,95-62,95	27,99	21	1,4
238	55,77-50,76	64,39-59,51	15,46	27	1,8

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

** a porcentagem de aumento foi calculada com base no comprimento dos grãos de pólen.

...continuação

TABELA 1 – Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, número e porcentagem de produção de grãos gigantes das plantas selecionadas da cultivar Quiñiqueli no primeiro ciclo (Exp. 1).

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	% aumento dos grãos gigantes**	Nº de grãos gigantes	% de grãos gigantes
257	52,82-51,13	64,22-62,07	21,57	19	1,3
262	54,83-52,82	66,22-64,50	20,78	20	1,3
287	55,10-51,60	64,93-62,78	17,83	19	1,3
292	54,76-49,17	61,28-55,64	11,90	15	1,0
293	52,78-51,60	66,65-65,45	26,27	21	1,4
298	51,27-49,12	64,76-62,88	26,28	15	1,0
299	50,96-46,87	66,41-59,53	30,34	55	3,7
307	54,46-53,11	66,28-65,40	21,71	30	2,0
313	52,89-50,74	61,28-59,38	15,85	23	1,5
323	50,16-47,58	66,65-64,03	32,87	32	2,1
355	53,47-49,73	65,94-63,79	23,32	20	1,3
361	52,46-49,45	68,16-62,14	29,92	20	1,3
365	57,12-48,22	66,11-65,29	15,73	16	1,1
369	49,88-47,88	65,29-63,14	30,90	22	1,5
377	54,05-49,42	64,22-59,62	18,81	37	2,5
393	53,75-51,32	64,50-60,67	20,00	20	1,3
430	52,74-50,59	65,27-61,36	23,77	20	1,3
465	52,61-51,17	61,92-61,81	17,69	49	3,3
478	53,38-51,23	70,74-65,53	32,50	31	2,1
479	54,61-50,31	68,80-62,63	25,98	16	1,1
480	55,90-53,94	66,71-64,50	19,35	35	2,3
531	55,69-51,39	66,88-61,40	20,11	27	1,8
Médias	53,21-50,24	65,63-64,46	23,34%	30,36	2,02%

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

** a porcentagem de aumento foi calculada com base no comprimento dos grãos de pólen, respectivamente.

TABELA 2 - Frequências de produção de grãos de pólen gigantes observadas nas plantas diplóides selecionadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Nº de plantas	% de pólen gigantes
30 (66,67%)	1 2%
8 (17,78%)	2 3%
5 (11,11%)	3 4%
1 (2,22%)	4 5%
1 (2,22%)	+ 9%
Total: 45 (100%)	

A literatura afirma que, em plantas não híbridas, a frequência de produção de gametas não reduzidos é menos de 1% (Ramsey & Schemske, 1998). Veilleux (1985) afirmou que a frequência de formação de gametas $2n$ é baixa e altamente variável. Na população total avaliada, 226 plantas, 54,87% delas (124 plantas) produziram grãos gigantes em frequências menores de 1%, ou seja, valores encontrados que confirmaram os dados da literatura.

Em alguns casos, houve variação de produção de grãos gigantes entre as flores de uma mesma inflorescência. Em determinadas plantas, foram observados casos onde uma mesma flor concentrou um grande número de macropólenos. Pode ser destacada a planta "20", que, além de apresentar a maior porcentagem de produção de grãos maiores (9,07%, 136 grãos), foram encontrados 128 deles em uma única flor (Apêndice 1). Estes dados não foram comparados com os da literatura porque os trabalhos consultados não discriminaram os resultados flor a flor.

Esta variação individual observada dentro desta população pode ser atribuída ao efeito do ambiente influenciando na produção de gametas $2n$, como já foi registrado (Veilleux, 1985) ou ainda, pelos diferentes graus de

penetrância e expressividade dos alelos que governam a produção destes gametas (Bretagnolle & Thompson, 1995).

A produção de pólen gigante encontrado por Parrott & Smith (1984) em populações diplóides de trevo vermelho variou de um a 84% em plantas individuais. Os autores encontraram 18 plantas produtoras de, no mínimo 1% de pólen gigante, entre 600 indivíduos analisados. Este valor representa 3% da população avaliada que produziram gametas possivelmente não reduzidos. Esta porcentagem é menor do que a encontrada na população de plantas da cultivar Quiñiqueli deste estudo, que foi de 19,91%.

McCoy (1982) encontrou ampla variação na freqüência de formação de pólen $2n$ na alfafa diplóide. A variação ocorreu em diversas condições ambientais e também entre diferentes flores de um mesmo clone dentro de um determinado ambiente. O autor encontrou, em um dos clones, produção de pólen $2n$ variando de quatro até 37% em três flores analisadas.

Em azevém perene, Wangenvoort & Den Nijs (1992) encontraram uma freqüência de gametas $2n$ que variou de zero a 16% entre os 17 genótipos avaliados. Em *Lotus tenuis*, houve variação de um a 11% de grãos gigantes, de acordo com o experimento conduzido por Negri (1992). Conicella et al. (1992) encontraram uma variação de zero a 90% de freqüência de aparecimento de grãos de pólen gigante em clones de híbridos diplóides em espécies de *Solanum*.

Na amostra dos grãos maiores medidos nas plantas selecionadas, obteve-se um aumento no tamanho dos grãos variando de 11,9 a 32,87% quando comparados com os grãos normais. A média geral da população foi de

23,34% de aumento. Estes limites (medidas mínimas para os grãos serem considerados gigantes) representam um aumento médio de, no mínimo 11% sobre o tamanho dos grãos reduzidos (n). Ramsey & Schemske (1998) citaram que os grãos não reduzidos devem ser de 30 a 40% maiores que os grãos normais n.

A Figura 4 apresenta duas ilustrações com grãos normais e grãos gigantes encontrados nas amostras observadas. Geralmente, este foi o aspecto observado sempre que se procurou grãos com medidas maiores que os grãos normais.

No Apêndice 2 estão apresentadas as médias de tamanho e os limites de variação de comprimento e largura dos grãos normais e gigantes encontrados nesta população selecionada.

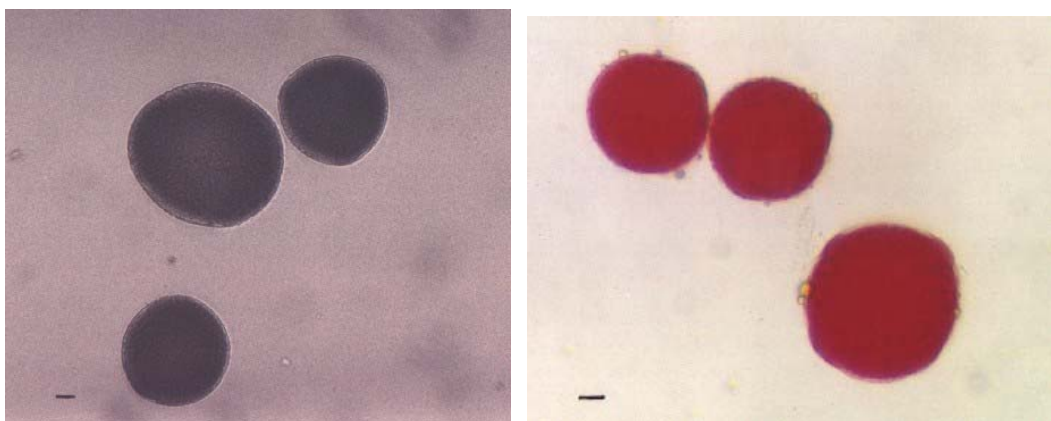


FIGURA 4 – Aspecto dos grãos de pólen normais (menores) e gigantes (maiores) encontrados nas amostras analisadas durante a fase de detecção de plantas produtoras de gametas não reduzidos. Escala: 10 μ m.

Schifino & Moraes-Fernandes (1986) compararam o tamanho do pólen de plantas de *Trifolium riograndense* diplóides e tetraplóides induzidos por colchicina. Em média, o diâmetro dos grãos das plantas diplóides foi de 26,04 μ m (eixo maior) e 25,07 μ m (eixo menor) e das plantas autotetraplóides foi de 34,04 μ m (eixo maior) e 32,71 μ m (eixo menor). Os grãos das plantas tetraplóides foram, em média, 30% maiores que os grãos das plantas diplóides.

Bretagnolle (2001) observou a produção de pólen $2n$ e a poliploidização espontânea de populações diplóides de *Anthoxanthum alpinum*. Seu estudo mostrou que o diâmetro dos grãos de pólen gigantes aumentou 55% em comparação com os grãos normais das plantas diplóides. O autor também comentou que, embora a análise morfológica seja aplicada para distinguir grãos n e $2n$ em muitas populações de plantas, este método pode fornecer uma estimativa aproximada de detecção de grãos de pólen $2n$.

Becerra Lopez-Lavalle & Orjeda (2002) analisaram grãos de pólen em amostras de batata doce e observaram que o tamanho do pólen $2n$ foi 30% maior do que o tamanho do pólen n , sendo facilmente identificados, medidos e quantificados.

Em um trabalho que procurou plantas produtoras de pólen $2n$ associadas com resistência ao fungo *Phytophthora infestans* em espécies selvagens de *Solanum*, os autores consideraram que os grãos de pólen gigantes eram aproximadamente 1,25 a 1,4 vezes maiores em diâmetro do que o pólen normal n (Zlesak & Thill, 2002).

4.2.2.2. Avaliações das plantas poliplóides importadas

Das 200 sementes inicialmente estabelecidas, a germinação foi de 44,5%, ou seja, 89 sementes germinaram. Destas, 34 se tornaram plantas adultas e 27 floresceram (74,41% das plantas adultas).

A maioria dos indivíduos avaliados para contagem do número cromossômico apresentou no mínimo dez células com 28 cromossomos, confirmando que eram tetraplóides. Algumas anormalidades foram observadas, como plantas com células com menos de 28 cromossomos e/ou com mais de 28 cromossomos. Essas irregularidades sugeriram a ocorrência de raízes quiméricas nesses poliplóides. Somente na planta T2-2 não foi registrado o número cromossômico e a planta T2-14 foi a que apresentou as maiores irregularidades, ficando indefinido o seu nível de ploidia (Apêndice 3).

Algumas células analisadas estão representadas na Figura 5. A Figura 5a mostra a planta T2-5 com 28 cromossomos, como na maioria das células das plantas desta população. A planta T1-8 (Figura 5b, 5c e 5d) representa um exemplo de anormalidades na contagem cromossômica: célula com mais de 28 cromossomos, com menos de 28, e com o esperado para a sua condição tetraplóide: 28 cromossomos. A Figura 5e mostra uma célula com 14 cromossomos, da planta T2-17.

Em poliplóides induzidos, é comum a ocorrência de mitoses irregulares, com a conseqüente formação de quimeras. Assim, células com mais ou menos cromossomos do que o número esperado para o poliplóide ocorrem com frequência (Sybenga, 1992). Neste caso, a ocorrência de células com mais ou menos 28 cromossomos confirmou esta afirmação.

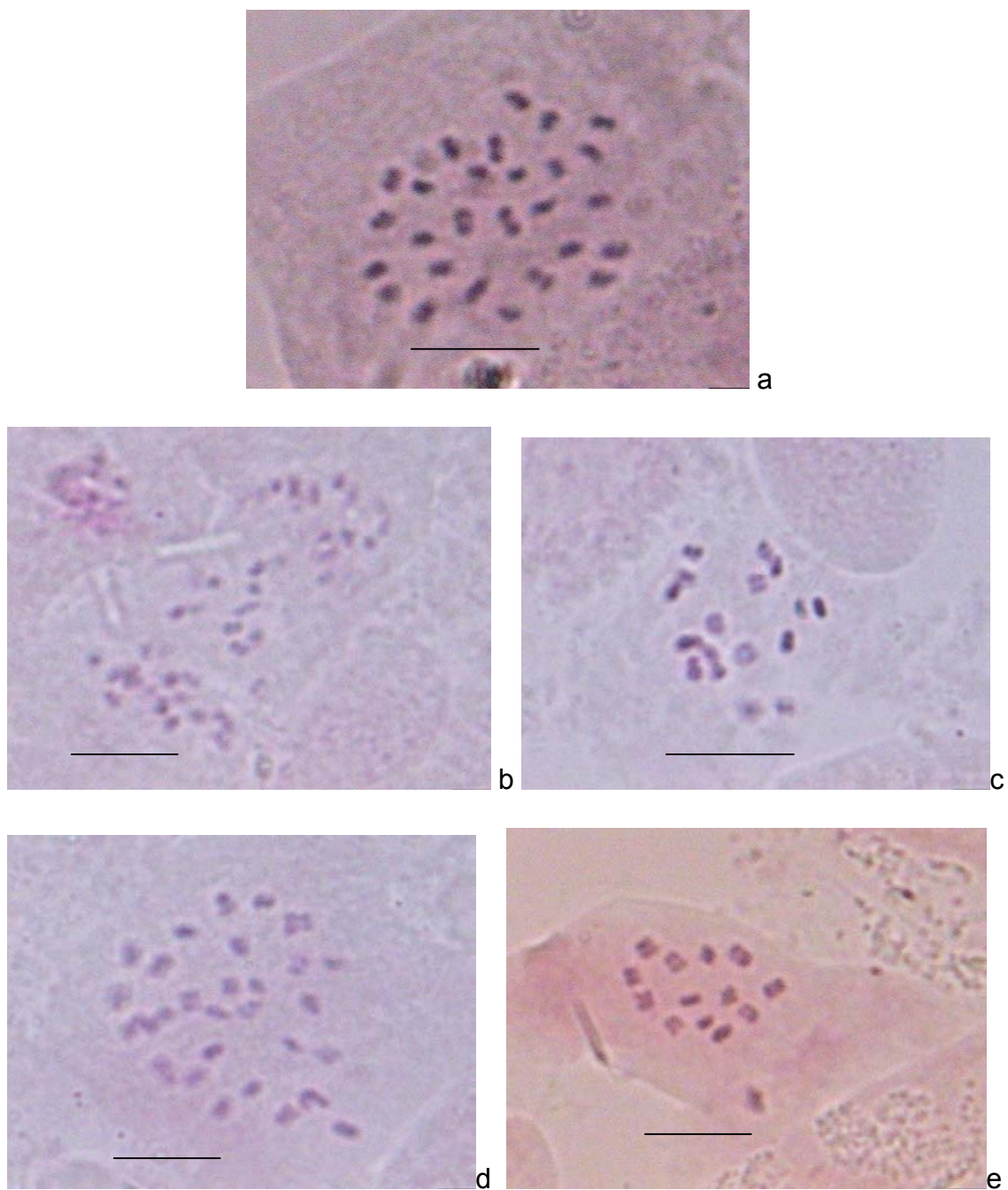


FIGURA 5 – Planta T2-5 (28 cromossomos); b, c, d) planta T1-8: mais de 28 cromossomos, menos de 28 cromossomos e 28 cromossomos, respectivamente; e) planta T2-17 (14 cromossomos). Escala: 10µm.

Em trevo vermelho, pode-se obter poliplóides com a aplicação de óxido nitroso (Giri et al., 1983). Segundo Taylor & Quesenberry (1996), este tipo de indução química não produz quimeras nas plantas, diferente do que ocorre com as tetraploidizadas com colchicina. As plantas deste experimento apresentaram as anormalidades referidas, e nas gerações mais avançadas (ciclos dois, três e quatro deste experimento), notou-se um aumento no número de raízes quiméricas, sendo impossível determinar o número cromossômico de alguns indivíduos.

Os resultados das avaliações do tamanho médio dos grãos de pólen das 27 plantas florescidas estão na Tabela 3. Na média geral dos indivíduos da população, o comprimento dos grãos foi de 64,0 μm e a largura foi de 62,19 μm , com as menores medidas, 49,66-48,32 μm , da planta T2-2 e as maiores medidas, 69,29-67,57 μm , da planta T2-9. Nas plantas diplóides selecionadas (Tabela 1), a média geral dos grãos gigantes foi de 65,53 μm e 62,31 μm (comprimento e largura, respectivamente), com variação de 61,28-55,64 μm (planta nº “292”) até 70,74-65,53 μm (planta nº “478”). Comparando estas medidas, é provável que os grãos gigantes encontrados nas plantas diplóides deste experimento sejam não reduzidos. Então, conclui-se que a seleção feita em busca de gametas não reduzidos neste trabalho foi realizada com êxito.

Mcoy (1982) comparou o diâmetro dos grãos de pólen em alfafa, considerando pólen $2n$ os que tinham o tamanho do pólen normal de plantas tetraplóides e pólen n os que tinham o tamanho normal de plantas diplóides.

Em um trabalho recente, Beuselinck et al. (2003) observaram que os grãos de pólen das plantas tetraplóides de *Lotus corniculatus* foram morfológicamente semelhantes ao pólen da espécie diplóide *L. glaber*, porém

maiores. O comprimento e a largura média do pólen gigante foi 1,56 e 1,58 vezes maior, respectivamente, do que o pólen das plantas diplóides.

Neste experimento, o critério usado para distinguir grãos normais e não reduzidos seguiu esta mesma regra de comparação, com base nos dados coletados das plantas diplóides e tetraplóides avaliadas.

TABELA 3 - Tamanho médio e limites de tamanho dos grãos de pólen das plantas tetraplóides avaliadas no primeiro ciclo de seleção do Experimento 1.

Indivíduo	Tamanho médio dos grãos de pólen (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*
T1-1	65,14-64,00	62,35-68,8/60,2-66,65
T1- 2	65,51-63,64	60,2-68,8/55,9-68,8
T1-4	68,00-66,28	62,35-73,1/62,35-70,95
T1-6	62,48-60,56	60,2-64,5/55,9-64,5
T1-7	68,71-66,52	64,5-79,55/62,35-77,4
T1-8	50,67-48,86	47,3-58,05/43,0-55,9
T1-9	63,64-61,98	55,9-68,8/55,9-64,5
T1-10	68,47-66,54	60,2-79,55/55,9-75,25
T1-14	65,07-64,86	55,9-75,25/55,9-75,25
T1-18	64,0-62,07	60,2-68,8/55,9-68,8
T1-21	62,41-59,61	58,05-66,65/55,9-64,5
T1-22	51,38-48,74	49,45-55,9/45,45-51,6
T2-2	49,66-48,32	43,0-51,6/43,0-51,6
T2-4	63,47-62,0	58,05-66,65/55,9-66,65
T2-5	68,30-67,01	55,9-77,4/55,9-77,4
T2-6	66,0-63,73	58,05-73,1/55,9-68,8
T2-7	67,08-65,79	60,2-70,95/60,2-70,95
T2-8	69,23-66,43	58,05-88,15/55,9-77,4
T2-9	69,29-67,57	64,5-73,1/62,35-70,95
T2-11	64,0-63,25	55,9-66,65/53,75-66,65
T2-12	67,50-66,22	62,35-77,4/62,35-75,25
T2-13	64,5-63,21	60,2-66,65/58,05-66,65
T2-14	68,64-66,43	62,35-81,7/62,35-81,7
T2-16	63,74-61,98	55,9-73,1/55,9-68,8
T2-17	57,25-53,90	49,45-73,1/45,15-68,8
T2-18	67,23-65,36	62,35-70,95/60,2-70,95
T2-19	66,11-64,56	53,75-73,1/53,75-73,1
Média geral	64,0-62,19	

**as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente.

Três plantas poliplóides que se destacaram pelo pequeno tamanho de seus grãos foram: T1-8, T1-22 e T2-2, cujos valores médios do tamanho dos grãos foram: 50,67-46,86 μ m, 51,38-48,74 μ m, 49,66-48,32 μ m (comprimento e largura), respectivamente, ou seja, do tamanho dos grãos considerados normais das plantas diplóides. Como o nível de ploidia não foi registrado na planta T2-2, não está descartada a hipótese de que esta não seja de fato um poliplóide, explicando o tamanho menor de seus grãos. Já nas plantas T1-8 e T1-22, em que foi confirmada sua condição tetraplóide, supõe-se que, apesar destas plantas terem raízes tetraplóides, a parte aérea pode ter apresentado quimeras, devido ao fato de que seus genitores foram induzidos quimicamente para poliploidização, como já citado anteriormente, e essas quimeras passaram para a geração seguinte. Então, é possível que uma inflorescência com flores diplóides tenha sido analisada, o que justificaria o tamanho dos grãos encontrado nestas plantas. Outra explicação é que realmente o pólen destas plantas fosse de tamanho menor, apesar de serem tetraplóides.

4.2.2.2.1. Considerações sobre a persistência dessas plantas

Na Tabela 4, está registrado o tempo de vida dos poliplóides. Nota-se que estes permaneceram vivos por um período de tempo grande, a maioria com duração de mais de um ano, comprovando que plantas poliplóides de trevo vermelho são mais persistentes do que seus diplóides relacionados, já que, pelo menos neste trabalho, foram cultivadas nas mesmas condições de temperatura e ambiente. As plantas diplóides selecionadas que ficaram em casa de vegetação até sua morte não ultrapassaram mais de um ano nestas

condições, normalmente não suportando as altas temperaturas do verão e morrendo nas épocas mais quentes.

TABELA 4 - Tempo de vida das 34 plantas poliplóides mantidas em condições de casa de vegetação no primeiro ciclo de seleção do Experimento 1.

Indivíduo	Data da germinação	Data da morte	Tempo aproximado de sobrevivência
T1-1	21/09/2000	04/2002	1,6 ano
T1- 2	21/09/2000	03/2003	2,5 anos
T1-3	21/09/2000	04/2003	2,6 anos
T1-4	21/09/2000	02/2002	1,4 ano
T1-6	21/09/2000	06/2001	9 meses
T1-7	21/09/2000	02/2003	2,4 anos
T1-8	21/09/2000	12/2002	2,2 anos
T1-9	21/09/2000	04/2003	2,6 anos
T1-10	21/09/2000	08/2001	11 meses
T1-13	21/09/2000	02/2002	1,4 ano
T1-14	21/09/2000	02/2002	1,4 ano
T1-16	21/09/2000	06/2001	9 meses
T1-17	21/09/2000	04/2001	7 meses
T1-18	21/09/2000	02/2002	1,4 ano
T1-20	21/09/2000	08/2001	11 meses
T1-21	21/09/2000	04/2002	1,6 ano
T1-22	21/09/2000	02/2002	1,4 ano
T2-1	21/09/2000	03/2002	1,5 ano
T2-2	21/09/2000	03/2001	6 meses
T2-3	21/09/2000	05/2002	1,7 ano
T2-4	21/09/2000	02/2002	1,4 ano
T2-5	21/09/2000	04/2003	2,6 anos
T2-6	21/09/2000	02/2002	1,4 ano
T2-7	21/09/2000	02/2002	1,4 ano
T2-8	21/09/2000	10/2001	1,2 ano
T2-9	21/09/2000	02/2002	1,4 ano
T2-11	21/09/2000	03/2002	1,5 ano
T2-12	21/09/2000	01/2002	1,3 ano
T2-13	21/09/2000	02/2003	2,4 anos
T2-14	21/09/2000	Viva em dezembro de 2003	
T2-16	21/09/2000	11/2001	1,2 ano
T2-17	21/09/2000	03/2002	1,5 ano
T2-18	21/09/2000	04/2003	2,6 anos
T2-19	21/09/2000	03/2002	1,5 ano

Atenção especial deve ser dada ao indivíduo T2-14, que, até dezembro de 2003, se manteve vivo, persistindo por mais de três anos, apesar de só ter florescido no primeiro e no último ano.

Também foi verificado, de uma maneira geral, que estas plantas foram menos susceptíveis a insetos e fungos, que atacam comumente esta espécie nos meses mais quentes do ano. Suas folhas são maiores e de coloração verde escuro, diferente das formas diplóides. Também as inflorescências das plantas tetraplóides são maiores do que as inflorescências das plantas diplóides (Figura 6). Estas diferenças comprovam mudanças fenotípicas que ocorrem quando o número cromossômico das plantas é duplicado.



FIGURA 6 – Diferenças morfológicas encontradas em plantas diplóides e tetraplóides: a) folhas (esquerda, planta diplóide e direita, planta tetraplóide); b) inflorescências (esquerda, planta diplóide e direita, planta tetraplóide). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2000.

Sob condições de campo, Giri et al. (1983) verificaram que hipoplóides ($2n-1$) de trevo vermelho foram menos vigorosos e produziram menos sementes do que os genótipos euplóides ($2n=28$) derivados de óxido nítrico. Porém, os hiperplóides ($2n+1$, $2n+2$) tiveram características similares às dos euplóides.

4.2.2.3. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes

Nos cruzamentos manuais, foram polinizadas 900 flores e 41 inflorescências de 21 plantas tetraplóides. Foram coletadas 59 sementes (6,55% das flores polinizadas produziram sementes). Na Tabela 5, está apresentado o número de sementes coletadas em cada planta-mãe polinizada. O registro dos pais envolvidos em cada polinização realizada encontra-se no Apêndice 4.

TABELA 5 - Produção de sementes dos cruzamentos 4X-2X no primeiro ciclo de seleção do Experimento 1.

Planta mãe	Número de flores polinizadas*	Nº total de sementes coletadas	% de flores que produziram sementes**
T1-1	20	2	10
T1-2	26+16+17+22+20=101	5	4,95
T1-4	30	12	40
T1-6	21	0	0
T1-7	24+20+30+32=106	4	3,77
T1-9	18	0	0
T1-10	23+16+30=69	2	2,89
T1-14	18+24+30=72	3	4,17
T1-18	24+32+21=77	6	7,79
T1-21	17+24+21=62	5	8,06
T2-2	16	0	0
T2-4	20	0	0
T2-5	21+18+21+20=80	3	3,75
T2-7	22	0	0
T2-8	15+19=34	2	5,88
T2-9	18	0	0
T2-11	20	4	20
T2-12	23	2	8,69
T2-13	20	1	5
T2-14	26+15=41	0	0
T2-17	30	8	26,67
TOTAL	900	59	Média = 6,56

*o somatório ocorreu quando foi polinizada mais de uma inflorescência por indivíduo;

** em relação ao número de flores polinizadas.

O pequeno conjunto de sementes obtidos nestes cruzamentos, com uma porcentagem de flores polinizadas que produziram sementes variando de zero a 40% em cada planta mãe polinizada, pode ser atribuído à baixa frequência de produção de pólen $2n$ nas plantas diplóides selecionadas e utilizadas como doadoras de pólen. Esta explicação foi discutida por Beuselinck et al. (2003), que trabalhou com o gênero *Lotus*. Os grãos de pólen n , em maior número e, portanto, em vantagem competitiva, impediram o desenvolvimento de mais sementes poliplóides, já que o desenvolvimento de sementes triplóides é mais difícil, devido ao desbalanço endosperma embrião (Ramsey & Schemske, 1998), tornando complicado realizar cruzamentos envolvendo diferentes níveis de ploidia.

A baixa porcentagem de sementes produzidas também foi verificada por outros autores em culturas de trevo vermelho. Armstrong & Cleveland (1970) polinizaram 459 flores de trevo vermelho em cruzamentos $4X - 2X$. Os autores conseguiram coletar apenas quatro sementes cheias e seis sementes murchas. Todas as sementes cheias germinaram, porém, apenas uma planta híbrida foi obtida.

Em cruzamentos na direção $2X - 4X$ de trevo vermelho, Taylor & Giri (1983) coletaram de 15 a 16000 sementes em oito gaiolas de polinização, constituídas de clones de diplóides e tetraplóides obtidos por óxido nitroso. Os pesquisadores não tiveram controle sobre o número de flores polinizadas, pois a polinização foi feita com abelhas melíferas. O número de plantas adultas obtidas variou de 31 a 154 entre as gaiolas.

McCoy (1982) conseguiu uma correlação positiva entre produção de sementes e frequência de surgimento de pólen $2n$ em cruzamentos $4X - 2X$ de

alfafa: quanto maior foi a porcentagem de pólen $2n$ encontrada entre as plantas doadoras de pólen, maior foi o conjunto de sementes coletadas em cada planta mãe polinizada.

No trabalho de Beuselinck et al. (2003), foram coletadas apenas 17 sementes em 692 flores polinizadas nos cruzamentos entre *Lotus corniculatus* (4X) x *L. glaber* (2X).

4.2.3. Segundo ciclo de seleção

4.2.3.1. Análises gerais da progênie

Das 59 sementes coletadas nos cruzamentos do primeiro ciclo, 48 germinaram (viabilidade de 81,35%), o que mostra a alta fertilidade das sementes.

Em vasos, 17 plantas adultas foram avaliadas quanto ao número cromossômico e viabilidade do pólen (Tabela 6, Apêndices 5 e 6). Foram encontradas três plantas tetraplóides ($2n=4x=28$), e oito indivíduos analisados foram triplóides ($2n=3x=21$). A Figura 7 mostra uma planta desta geração, T1-2 I1. A Figura 8 mostra os cromossomos da triplóide T2-12 I1 e da tetraplóide T1-4 I2. Em quatro plantas (T1-4 I6, T2-5 I2, T2-5 I3 e T2-11 I3), não foi possível avaliar o número cromossômico, pois não houve coleta suficiente de pontas de raiz próprias para as análises. Em uma planta, T2-11 I2, ficou a dúvida se esta poderia ser um triplóide, já que somente sete células foram analisadas e

TABELA 6 - Tamanho dos grãos de pólen, número cromossômico e estabilidade do pólen de plantas de trevo vermelho pertencentes ao segundo ciclo de seleção (Exp. 1).

Indivíduo	Nº cromossômico	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*	% pólen normal	% pólen gigante	% grãos inviáveis
T1-2 I1	28 (?)	62,28-59,34	55,9-68,8/55,9-64,5	42,87	40,27	16,86
T1-4 I1	21	64,99-63,70	53,75-73,1/51,6-70,95	38,27	14,73	47,0
T1-4 I2	28	nf	Nf	nf	nf	nf
T1-4 I3	21	68,93-67,78	55,9-86/53,75-86	38,53	32,73	28,74
T1-4 I4	28	61,12-59,34	53,75-66,65/53,75-64,5	40,13	34,6	25,27
T1-4 I5	21	3nf	Nf	nf	nf	nf
T1-4 I6	NR	65,42-63,42	62,35-68,8/58,05-66,65	54,2	14,67	31,13
T1-14 I1	28	nf	Nf	nf	nf	nf
T1-21 I1	21	nf	Nf	nf	nf	nf
T1-21 I2	21	64,99-61,98	53,75-75,25/51,6-70,95	41,87	38,47	19,66
T2-5 I1	21	59,77-57,19	51,6-68,8/49,45-66,65	42,87	4,4	52,73
T2-5 I2	NR	55,83-54,18	49,45-64,5/49,45-64,5	64,67	13,53	21,8
T2-5 I3	NR	64,99-60,04	51,6-86/51,6-75,25	54,4	9,88	35,72
T2-11 I1	21	65,79-64,71	53,75-75,25/53,75-73,1	21,73	19,33	58,94
T2-11 I2	21 (?)	nf	nf	nf	nf	nf
T2-11 I3	NR	nf	nf	nf	nf	nf
T2-12 I1	21	54,76-53,04	49,45-62,35/49,45-60,2	51	15,2	33,8
Média		62,62-60,43		44,59	21,61	33,78

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

I = irmão;

NR= não registrado;

nf= não floresceu.

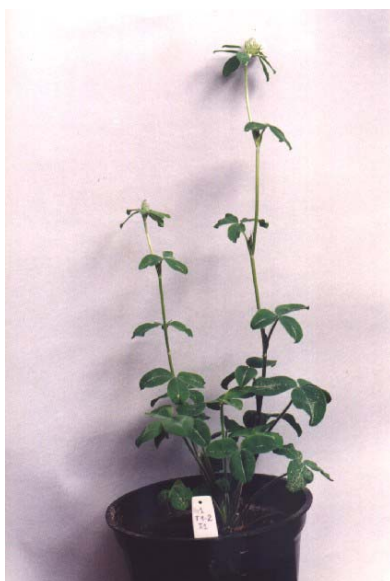


FIGURA 7 – Planta T1-2 I1, pertencente ao segundo ciclo de seleção (Exp. 1) (faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2001).

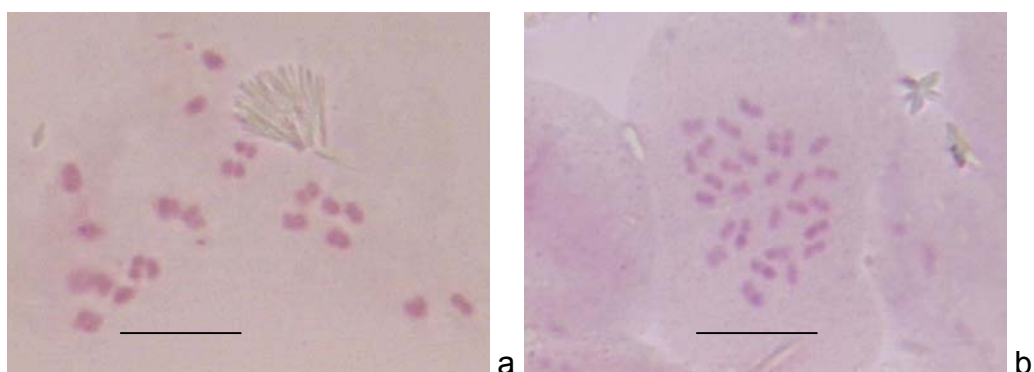


FIGURA 8 – Cromossomos das plantas do segundo ciclo de seleção (Exp. 1): a) T2-12 I1 (triplóide); b) T1-4 I2 (tetraplóide). Escala: 10 μ m.

apresentaram 21 cromossomos. Além disso, como esta planta não floresceu, faltaram análises de tamanho e estabilidade do pólen para poder comparar e inferir sobre seu nível de ploidia. A planta T1-2 I1 também não pôde ser determinada, pois, após inúmeras tentativas, seis células foram analisadas;

destas, com certeza, quatro apresentaram 28 cromossomos. Nesta geração também ocorrerem muitas raízes quiméricas, assim como na análise dos genitores femininos (tetraplóides) no primeiro ciclo de seleção (Apêndice 6).

Do total de flores polinizadas (900), 0,89% delas produziram progênie triplóide e 0,33% produziram progênie tetraplóide, portanto, a produção de tetraplóides nestes cruzamentos foi de 3,33 para cada 1000 flores polinizadas.

A presença de plantas tetraplóides nesta população pode indicar a funcionalidade de gametas não reduzidos que fecundaram a planta mãe. Se isto ocorreu, pode-se afirmar que a seleção das plantas produtoras de gametas não reduzidos foi eficiente nesta etapa do experimento. Veilleux (1985) relatou que as plantas que apresentam níveis de ploidia não esperados nas progênies de cruzamentos $4X - 2X$ ou $2X - 4X$ são utilizadas para confirmar a ocorrência de gametas não reduzidos nesses organismos.

Na direção $4X - 2X$, Taylor & Wiseman (1987) utilizaram plantas de trevo vermelho tetraplóides com folhas brancas (caráter recessivo) como critério para separar a progênie híbrida daquela vinda de autofecundação. Das 218 sementes produzidas nas gaiolas de polinização (com clones dos progenitores femininos), 14 plantas morreram, 119 plantas apresentaram flores brancas, confirmando a autofecundação e 36 plantas tinham flores vermelhas (híbridas). Nestas, foram encontradas 33 triplóides e 3 tetraplóides. Os autores estimaram que a frequência de aparecimento de triplóides foi de um para cada 954 flores polinizadas e a frequência de tetraplóides foi de um para cada 10000 flores polinizadas. Os autores concluíram que, provavelmente, os tetraplóides surgiram via não redução gamética.

Taylor & Berger (1989) também examinaram a progênie de cruzamentos $2X - 4X$ e $4X - 2X$ em gaiolas de polinização com trevo vermelho. Na direção $2X - 4X$, houve uma baixa porcentagem de triplóides (de zero a 2,3%) e uma alta porcentagem de plantas tetraplóides (de 0,6 a 66,2%). A presença de $4X$ nestes cruzamentos indicou a provável não redução gamética feminina. Nos cruzamentos $4X-2X$, 13,3% da progênie foi de triplóides e 86,7% das plantas foram tetraplóides. Os autores concluíram que cruzamentos $4X - 2X$ foram mais eficientes para produzir triplóides e tetraplóides do que cruzamentos $2X - 4X$, mas salientaram a necessidade de algum marcador morfológico (característica de folha marcada ou outro marcador genético) para eliminar progênie de autofecundação nos cruzamentos $4X - 2X$. Este procedimento, porém, não é necessário em cruzamentos $2X - 4X$, pois a simples presença de plantas triplóides e tetraplóides no progenitor feminino diplóide já é suficiente para identificar progênie híbrida.

Bingham (1968) obteve plantas de alfafa com diferentes níveis de ploidia ao realizar cruzamentos $4X - 2X$: a progênie híbrida foi constituída de 31 triplóides e 53 tetraplóides em 9000 flores polinizadas. A freqüência de produção de triplóides foi de quatro em cada 1000 flores polinizadas. Nas discussões deste trabalho, o autor salientou que há uma eficiente transferência de germoplasma em cruzamentos $4X - 2X$, baseado no número de tetraplóides híbridos obtidos, podendo ser transferido genes da alfafa diplóide. Indivíduos triplóides são valiosos em estudos citogenéticos e podem ser usados para transferir genes para o nível diplóide ou tetraplóide por retrocruzamento para o nível de ploidia desejado.

Uma outra possibilidade do surgimento de plantas tetraplóides nestes cruzamentos é que tenha ocorrido quebra do sistema de auto-incompatibilidade, também chamada de pseudo-autocompatibilidade. Otto & Whitton (2000) afirmaram que sistemas genéticos auto-incompatíveis tendem a ser quebrados em poliplóides, resultando em mais altas taxas de autofecundação nos poliplóides do que nos progenitores diplóides. O trevo vermelho, o branco e o “alsike” podem ser autofecundados através da pseudo-autocompatibilidade, que é variável entre as plantas e é um caráter herdável (Taylor, 1987).

Quebra de auto-incompatibilidade foi observada em Kentucky, em gaiolas com clones de plantas de trevo vermelho com marcadores de folha. Observou-se que nas gaiolas com alta porcentagem de autofecundação a produção de sementes foi menor do que naquelas com mais alta porcentagem de fecundação cruzada (Taylor & Anderson, 1980), comprovando a tendência de que o sistema de reprodução predominante e preferencial em trevo vermelho é a alogamia.

Pseudo-autocompatibilidade também explicou a origem de sementes diplóides em cruzamentos $2X - 4X$ de três cultivares de trevo vermelho, em que os diplóides eram clones e os tetraplóides eram derivados de óxido nitroso (descritos por Taylor et al., 1976) (Taylor & Giri, 1983).

Meglic & Smith (1992) compararam sementes produzidas por autofecundação e por fecundação cruzada (através de polinização manual) em populações tetraplóides de trevo vermelho. Houve produção de sementes em plantas autofecundadas (frequência de 0,14% em cruzamentos efetuados para

obtenção de poliplóides sexuais, 0,14% em plantas duplicadas com colchicina e 0,08% nas duplicadas com óxido nitroso), indicando a habilidade das plantas em expressar alelos S comuns. É possível que no mínimo dois alelos em comum sejam capazes de romper o sistema de auto-incompatibilidade.

Na revisão de Bretagnolle & Thompson (1995), os autores afirmaram que a fertilidade dos triplóides é mais baixa do que dos diplóides ou dos tetraplóides, com freqüentes diferenças entre os gametas masculinos e femininos.

Esta baixa viabilidade descrita para triplóides encontrou apoio no presente trabalho, pela verificação dos índices de grãos viáveis e inviáveis (Tabela 6). Grãos de pólen considerados de tamanhos normais e corados, portanto viáveis, variaram de 21,73 a 51,0% entre as plantas triplóides desta geração, com média geral de 39,04%. Este índice pode ser considerado baixo, se for comparado com a viabilidade dos grãos de plantas diplóides observadas nos três ciclos de seleção do Experimento 2 deste trabalho.

Grãos de pólen inviáveis variaram de 19,66 até 58,94% nas plantas triplóides, com média de 34,51%. A planta T2-11 I1 apresentou a mais baixa porcentagem de grãos normais e a mais alta porcentagem de grãos inviáveis dentro da população. Na planta tetraplóide que floresceu, T1-4 I4, grãos inviáveis apareceram em 25,27% das amostras avaliadas e, somando a porcentagem de grãos normais e gigantes verificada nesta planta, a porcentagem de viabilidade foi de 74,73%, próxima à viabilidade do triplóide T1-21 I2 (80,34%), da planta T2-5 I2 (78,2%), sem definição do nível de ploidia e da planta T1-2 I1 (83,14%), que pode ser um tetraplóide. Verificou-se que a viabilidade dos grãos de pólen é maior neste tetraplóide, quando comparado à

maioria dos triplóides analisados. Porém, como houve poucas plantas avaliadas, ficou difícil deduzir sobre a maior estabilidade para a produção de pólen nesta progênie, que apresentou raízes com diferentes níveis de ploidia e muitas irregularidades na microsporogênese. Um aspecto geral dos grãos de pólen da planta T1-4 I6 é um exemplo da ocorrência das irregularidades meióticas (Figura 9).



FIGURA 9 - Planta T1-4 I6: aspecto dos grãos de pólen: normal, gigante e inviáveis (parcialmente chio e micropólen vazio). Escala: 10 μ m.

Giri et al. (1983) encontraram maior estabilidade do pólen na progênie euplóide (80%, em média) do que na descendência aneuplóide (média de 57%) na população tetraplóide derivada de óxido nitroso em trevo vermelho. Taylor & Wiseman (1987) também detectaram que plantas diplóides e tetraplóides de trevo vermelho apresentaram maior viabilidade de pólen do que os indivíduos eutriplóides ($2n=3X=21$) e aneutriplóides ($2n=3X=22$) derivados de cruzamentos $4X - 2X$. Em uma planta tetraplóide vinda de fecundação cruzada, a estabilidade do pólen foi de 88%. Nas plantas

tetraplóides autofecundadas, foi de 78 e 75% e nos diplóides parentais foi superior a 90%. Os triplóides tiveram, em média, 71% de pólen viável.

A análise de variância para porcentagens de produção de pólen normal, gigante e inviáveis realizada, considerando cada família de meio irmão como um tratamento, não mostrou diferença significativa para estas variáveis pelo teste F (Apêndice 7).

A média do tamanho dos grãos de pólen (62,62 - 60,43µm, comprimento e largura, respectivamente) pode ser comparada ao tamanho dos grãos gigantes encontrados nas plantas diplóides do primeiro ciclo de seleção (média geral de 65,53 e 64,46 µm, comprimento e largura, respectivamente). Também não há diferença para o tamanho médio dos grãos de pólen entre as famílias avaliadas. O tamanho médio dos grãos normais das plantas T2-5 I2 e T2-12 I1 foi semelhante, mais baixo do que os demais observados e os mais distintos do restante da população.

Foi difícil distinguir grãos normais e grãos gigantes, apesar de estarem separados na tabela, pois, muitas vezes, as diferenças de tamanho foram muito sutis. A tendência observada foi que os grãos normais tinham tamanhos médios comparáveis com o tamanho estabelecido para os grãos gigantes. Convém salientar ainda, que os grãos gigantes encontrados não necessariamente são $2n$, podem ser grãos aneuplóides: $2n+1$, $2n+2$, $2n-1$, $2n-2$, etc., portanto, tornando ainda mais difícil sua classificação.

Yan et al. (1997) estimou a frequência de gametas $2n$ em *Actinidia* através do seguinte cálculo: $(2D+Tr)/(2D+3Tr+4T)$, onde D é o número de díades, Tr é o número de tríades e T é o número de tétrades ocorrentes na telófase II da meiose. Se este cálculo fosse realizado, com base em análises de células mãe de grãos de pólen, seria mais precisa a determinação dos grãos de pólen gigantes, e seria possível distinguir grãos n e grãos $2n$. Entretanto, esta avaliação não pôde ser feita no presente trabalho. Após inúmeras tentativas, não foram encontrados botões florais no estágio de tétrade entre as amostras observadas. Além disso, devido ao volume de trabalho, não foi possível despendar mais tempo para estas análises.

O desenvolvimento de sementes híbridas triplóides em trevo vermelho, embora em número reduzido, neste experimento, parece ser justificado pela capacidade que algumas plantas tem de tolerar balanços diferentes dos tecidos endospermicos e embrionários (maiores detalhes na Revisão Bibliográfica, páginas 20 e 21). Nos cruzamentos recíprocos interploidia, quando o progenitor feminino é tetraplóide, a produção dos triplóides é mais eficaz, devido à exigência imposta pelo conceito do Balanço Endosperma-Embrião (Bretagnolle & Thompson, 1995). Parrott & Smith (1984) realizaram cruzamentos $4X - 2X$ para determinar a funcionalidade do pólen de plantas selecionadas para produção de gametas não reduzidos. Os autores descreveram que trevo vermelho tem um forte bloco triplóide que age como uma força seletiva em cruzamentos interploidia, onde embriões $4X$ sobrevivem enquanto $3X$ abortam. Seguindo esta norma, espera-se que somente progênies tetraplóides ocorram, resultado de gametas $2n$ funcionais do progenitor

masculino ou quebra do sistema de auto-incompatibilidade do progenitor feminino. Os pesquisadores não registraram nenhuma planta 3X no experimento. Toda a progênie tetraplóide nos cruzamentos 4X-2X indicou a funcionalidade dos gametas masculinos não reduzidos.

Análises meióticas nas plantas descendentes dos cruzamentos 4X – 2X de trevo vermelho do trabalho de Taylor & Wiseman (1987), mostraram segregações desiguais nas progênies eutriplóides e aneutriplóides. Este dado indica que segregações desiguais que ocorrem durante a meiose em indivíduos autopoliplóides levam a tamanhos variáveis de grãos de pólen, embora não se possa esclarecer se são funcionais.

Também nesta etapa deste experimento foi observado que, em nível triplóide, ocorreu uma mistura de formas e tamanhos de grãos de pólen, como mostra os valores apresentados na Tabela 6.

Segundo Stebbins (1971), a formação de quadrivalentes, trivalentes e univalentes no lugar de bivalentes durante a meiose, causam irregularidades na segregação cromossômica, tendo como consequência a formação de gametas com números cromossômicos não balanceados.

A literatura confirmou o que foi observado nesta etapa do experimento: em casos de autopoliplóide, triplóides são tão vigorosos quanto os tetraplóides e morfologicamente indistinguíveis (Bretagnolle & Thompson, 1995). Taylor & Wiseman (1987) afirmaram que tetraplóides são mais fáceis de distinguir dos diplóides em condições de crescimento, mas os triplóides devem apresentar-se como uma mistura entre diplóides e tetraplóides.

As plantas triplóides e tetraplóides obtidas neste experimento assemelharam-se, morfológicamente, mais entre si, do que com os diplóides estabelecidos.

4.2.3.2. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes

Seis plantas que floresceram nesta etapa foram utilizadas nos cruzamentos recíprocos para dar continuidade às avaliações. Oito inflorescências e 143 flores foram polinizadas, resultando em 31 sementes cheias (21,46% das flores polinizadas produziram sementes) (Tabela 7). Nenhum dos cruzamentos envolveu ambos os pais com o nível de ploidia determinado, pois foram poucas plantas que serviram como progenitoras. Isto deixou dúvidas quanto à capacidade de cruzamentos entre diferentes níveis de ploidia nesta etapa.

TABELA 7 - Produção de sementes nas plantas de trevo vermelho no segundo ciclo de seleção (Exp. 1).

Planta-mãe X pólen	Nível de ploidia envolvido	Nº flores polinizadas	Nº sementes coletadas	% flores que produziram sementes*
T1-2 I1 X T2-5 I2	4X - ?	3	3	100
T1-4 I6 X T1-21 I2	? - 3X	25	25	100
T1-21 I2 X T1-4 I6	3X - ?	30	1	3,33
T2-5 I1 X T2-5 I2	3X - ?	28	1	3,57
T2-5 I2 X T2-5 I1	? - 3X	21	1	4,76
T2-5 I2 X T2-5 I3	? - ?	8	0	0
T2-5 I2 X T1-2 I1	? - 4X	10	0	0
T2-5 I3 X T2-5 I2	? - ?	18	0	0
T1-4 I3 x ??	3X - ??	NP	1	-
Totais		143	31 +1(NP)	Média = 21,46

*em relação ao número de flores polinizadas;

I = irmão;

NP=não polinizada;

?= número cromossômico não registrado;

??= sem controle do pai;

Ainda assim, com certa cautela, pode-se dizer que plantas 3X são férteis entre si e com plantas 4X, indicando que triplóides são apenas semi-estéreis. Esta afirmativa só levou em consideração o fato de que, em algum desses cruzamentos que produziu sementes, deve ter havido a união de gametas com números cromossômicos desbalanceados.

Taylor & Chen (1988) examinaram a fertilidade da progênie de cruzamentos em trevo vermelho: 2X – 3X, 3X – 2X, 3X – 3X, 3X – 4X e 4X – 3X. Todos os cruzamentos produziram sementes, com germinação média de 66%. Os autores verificaram que a fertilidade dos cruzamentos 3X – 4X foi significativamente mais baixa do que dos cruzamentos 2X – 3X. Eutriplóides ($2n=3x=21$) foram mais férteis do que os aneutriplóides ($2n=3x=22$), provavelmente devido à presença do cromossomo extra nestas últimas. A porcentagem de germinação dos cruzamentos 3X – 4X foi significativamente mais baixa do que dos cruzamentos 4X – 3X. Neste último, 100% das sementes eram cheias. Os autores concluíram que esta diferença entre os cruzamentos parece ter pequena relevância biológica.

Ramsey & Schemske (1998) e Bretagnolle & Thompson (1995) confirmaram a possibilidade de formação de plantas tetraplóides através da chamada “ponte triplóide”, onde indivíduos 3X são um passo inicial para formação dos tetraplóides desejados.

O baixo número de sementes produzidas nos cruzamentos também pode ser atribuído à depressão endogâmica das uniões entre irmãos, principalmente na família T2-5, onde vários irmãos foram cruzados entre si, com produção de no máximo uma semente em cada inflorescência polinizada. Por outro lado, os cruzamentos que obtiveram mais sucesso (100% das flores

polinizadas produziram sementes) foram justamente os que envolveram plantas de famílias diferentes: T1-4 I6 X T1-21 I2 e T1-2 I1 X T2-5 I2.

Uma semente foi produzida na planta T1-4 I3 ($2n=3x=21$) que não havia sido polinizada manualmente (Tabela 7). Esta semente pode ser resultante da quebra do sistema de autoincompatibilidade, como já foi relatado em trevo vermelho (Taylor & Giri, 1983; Parrott & Smith, 1984; Meglic & Smith, 1992).

4.2.4. Terceiro ciclo de seleção

4.2.4.1. Análises gerais da progênie

Todas as 32 sementes coletadas no segundo ciclo de seleção foram postas para germinar em 25/04/2002. A germinação foi de 100%. Porém, após o transplante para vasos em casa de vegetação, apenas cinco plantas sobreviveram. Os indivíduos que reataram eram irmãos, ou seja, suas sementes foram coletadas da mesma planta mãe, T1-4 I6, que foi polinizada por um único progenitor masculino: T1-21 I2. As plantas sobreviventes foram assim denominadas: **a, b, c, d, e**.

A Tabela 8 e os Apêndices 8 e 9 apresentam os dados coletados destas plantas quanto ao tamanho médio e viabilidade dos grãos de pólen e contagem cromossômica para determinar o nível de ploidia. Nota-se uma baixa viabilidade do pólen, como já foi verificado também nas plantas do segundo ciclo, com valores semelhantes nas três plantas avaliadas.

TABELA 8 - Número cromossômico, tamanho médio e porcentagem de estabilidade do pólen de plantas de trevo vermelho pertencentes ao terceiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Indivíduo	Nº cromossômico	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Limites Comprimento/largura (μm)*	% pólen normal	% pólen gigante	% grãos inviáveis
a	21 (?)	68,25-65,92	60-72,5/55-70	65,0	6,4	28,6
b	28	nf	Nf	nf	nf	nf
c	28 (?)	68,25-65,32	57,5-77,5/57,5-75	49,27	21,26	29,47
d	NR	nf	Nf	nf	nf	nf
e	?	66,57-64,92	60-77,5/57,5-70	56,53	14,07	29,4
Média		67,69-65,39		56,93	13,91	29,16

*a medida foi feita tomando o comprimento e largura dos grãos de pólen, respectivamente;

NR= não registrado;

nf= não floresceu;

O tamanho dos grãos foi, em média, menor do que os valores obtidos no segundo ciclo, mas aqui também houve uma mistura de tamanhos e formas dos grãos em todas as amostras analisadas, confirmando a dificuldade de distinguir grãos normais e grãos gigantes em plantas vindas de cruzamentos interploidia.

Inúmeras células com números cromossômicos variáveis foram encontradas nas pontas de raiz das plantas híbridas. Por isso, ficou difícil confirmar o nível de ploidia, principalmente dos indivíduos “c” e “e”. A Figura 10 mostra algumas células de raiz destas plantas, com a variação observada nos números cromossômicos.

Os dados obtidos neste experimento não foram suficientes para concluir sobre a ocorrência de algum indivíduo aneuplóide, embora não seja descartada esta possibilidade, já que em vários casos individuais observados, foram registradas células de raiz com 22, 23, 24 e 27 cromossomos. Porém, devido a algumas células apresentarem sobreposição dos cromossomos, ficaram dúvidas quanto à possibilidade de ocorrência de plantas aneuplóides nesta população.

Para deduzir melhor sobre o nível de ploidia destas plantas e eliminar as incertezas, seria necessário analisar células meióticas no estágio do botão floral. Porém, isso não foi possível, pois o estágio de florescimento foi muito curto, as plantas produziram poucas flores e estas foram utilizadas para a realização dos cruzamentos. Mesmo assim, em várias etapas deste trabalho, tentou-se verificar a meiose em alguns botões florais coletados no decorrer das avaliações. Porém, esta prática não obteve sucesso. Não foi possível examinar

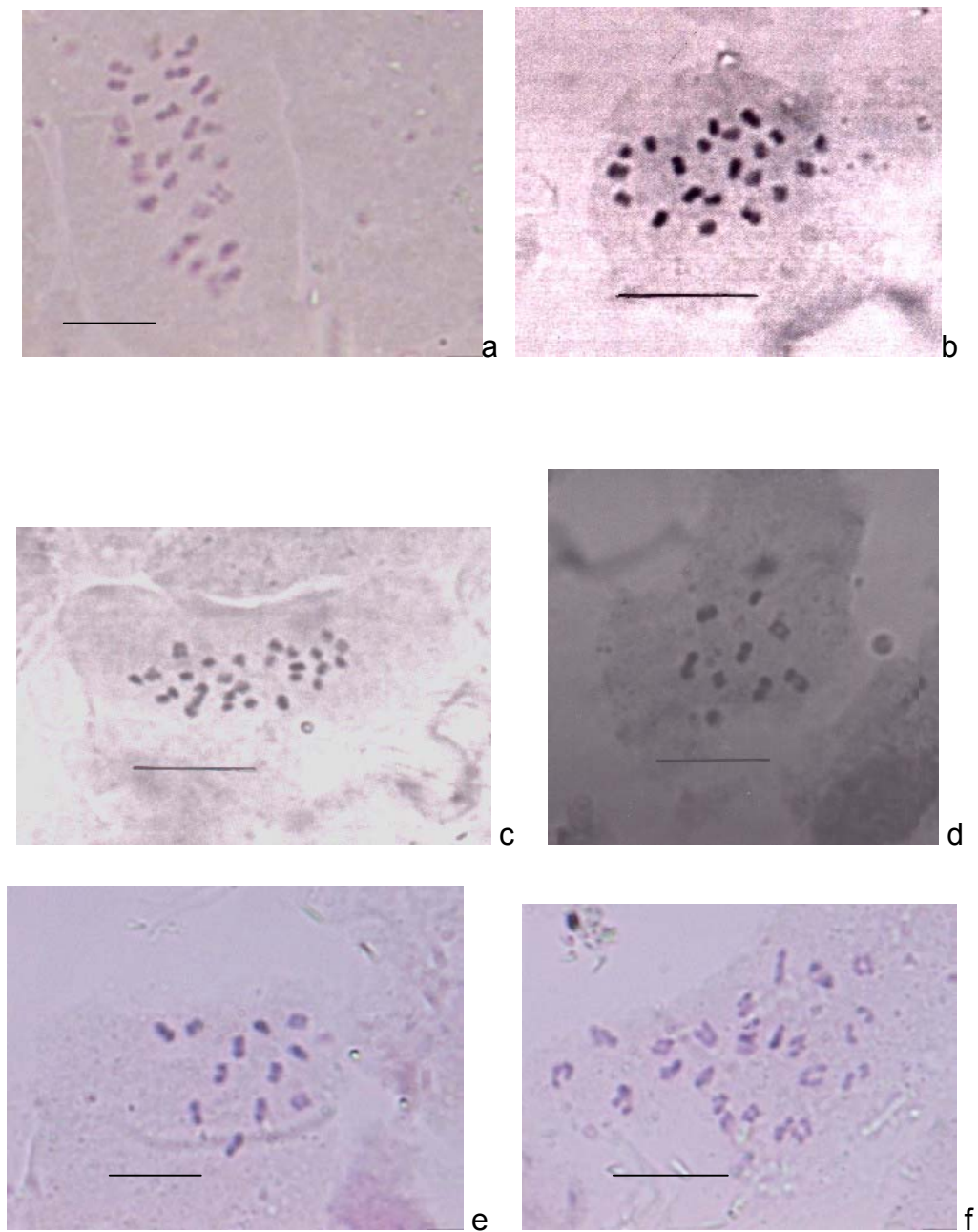


FIGURA 10 – Cromossomos das plantas do terceiro ciclo de seleção (Exp. 1): a) planta “b” (28 cromossomos); b, c) planta “c” (21 e 28 cromossomos, respectivamente); d, e, f) planta “e” (9,12 e 28 cromossomos, respectivamente). Escala: 10 μ m.

o comportamento meiótico das plantas, porque não foi encontrada nenhuma célula neste estágio nos botões florais analisados. Evans (1955), após inúmeras tentativas, concluiu que, em trevo vermelho, o ciclo meiótico é muito curto, o que tornou impossível a contagem cromossômica em células mãe de pólen e em anteras jovens no seu experimento.

4.2.4.2. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes

Houve polinização em somente uma ocasião de florescimento e o resultado está na Tabela 9.

TABELA 9 - Produção de sementes dos cruzamentos manuais realizados em plantas de trevo vermelho no terceiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Planta mãe X pólen	Nível de ploidia envolvido	Nº flores polinizadas	Nº sementes coletadas	% de flores que produziram sementes
a x e	3X – ?	16	11	68,75
e x a	? – 3X	15	15	100
Totais		31	26	Média = 83,87

? = número cromossômico não determinado

Houve uma considerável produção de sementes, já que o índice de 83,87% de sementes coletadas sobre o total de flores polinizadas representa um alto valor de produção de sementes. A fertilidade de triplóides e tetraplóides é de grande importância, pois pode facilitar a transferência de características desejáveis em níveis de ploidia diferentes (Taylor & Wiseman, 1987).

4.2.5. Quarto ciclo de seleção

4.2.5.1. Análises gerais da progênie

As 26 sementes foram postas para germinar em abril de 2003. Das 11 sementes da planta mãe “a”, dez germinaram (90,90%), e das 15 sementes da planta mãe “e”, a germinação foi de 100%. Esta alta porcentagem de germinação confirma o sucesso obtido nestes cruzamentos com plantas com níveis de ploidia provavelmente diferentes.

Em vasos, foram transferidas 13 plântulas que sobreviveram e se tornaram adultas: oito plantas da mãe “a”, denominadas: **a1, a2, a3, a4, a5, a6, a7 e a8** e cinco plantas da mãe “e” denominadas: **e1, e2, e3, e4 e e5**.

Nas Tabelas 10 e 11 e no Apêndice 10 estão apresentados os dados referentes a número cromossômico, tamanho médio e porcentagem de viabilidade do pólen das plantas deste quarto ciclo de seleção. Nem todas floresceram, apesar de terem alcançado a fase adulta.

A análise de variância para porcentagem de grãos normais, gigantes e inviáveis não mostrou diferença significativa a um nível de significância de 5%, na comparação de médias das plantas das duas famílias desta geração: “a” e “e” (Apêndice 11). Porém, observando a Tabela 10, nota-se diferença entre os indivíduos para estas três variáveis, mas não para tamanho médio de grãos de pólen.

Nesta geração, como na anterior, foram observadas altas porcentagens de grãos de pólen inviáveis, ultrapassando 50% das amostras analisadas em algumas plantas.

A alta porcentagem de grãos inviáveis nas plantas deste experimento mostra que as irregularidades durante a divisão celular ocorrem na fase meiótica em botões florais, e não só em células somáticas de pontas

TABELA 10 - Número cromossômico e porcentagem de estabilidade do pólen de plantas de trevo vermelho pertencentes ao quarto ciclo de seleção (Exp. 1).

Indivíduo	Nº cromossômico	Tamanho médio dos grãos pólen (μm)*	Limites Comprimento/largura(μm)*	% pólen normal	% pólen gigante	% grãos inviáveis
a1	?	71,0-69,0	57,5-80/55-80	48,47	20,93	30,6
a2	?	68,17-65,32	57,5-75/57,5-75	65,14	8,73	26,13
a3	?	nf	nf	Nf	nf	nf
a4	?	69,75-67,42	57,5-77,5/57,5-77,5	48,33	12,2	39,47
a5	21(?)	58,34-57,19	51,6-66,65/51,6-64,5	44,0	4,27	51,73
a6	21 (?)	72,17-69,75	60-85/57,5-77,5	13,2	9,2	77,6
a7	?	58,84-56,69	53,75-66,65/51,6-62,35	59,8	6,8	33,4
a8	?	nf	nf	Nf	nf	nf
e1	21(?)	58,98-57,98	51,6-70,95/51,6-68,8	20,94	4,93	74,67
e2	21(?)	70,25-68,57	62,5-75/60-75	55,4	8,07	36,53
e3	?	nf	nf	nf	nf	nf
e4	?	nf	nf	nf	nf	nf
e5	21(?)	58,76-56,90	51,6-62,35/49,45-62,35	60,53	4,07	35,4
Média geral		59,67-57,91				

* medidas feitas tomando o comprimento e largura dos grãos de pólen, respectivamente;

? = número cromossômico não determinado;

nf = não floresceu.

de raiz. Isto traz como conseqüência uma maior produção de gametas com números cromossômicos desbalanceados nestas plantas, diminuindo a fertilidade destes indivíduos.

TABELA 11 – Freqüências de diferentes números cromossômicos somáticos registrados nas plantas do quarto ciclo de seleção (Exp. 1).

Planta	Número cromossômico					Nº total de células analisadas	Nº cromossômico determinado
	21	28	menos de 21	entre 21 e 28	mais de 28		
	Número de células						
a1	4	2	0	19	2	27	?
a2	6	4	3	22	0	35	?
a3	9	1	9	13	0	32	?
a4	8	7	1	10	0	26	?
a5	24	2	2	18	0	46	21 (?)
a6	15	4	1	13	0	33	21 (?)
a7	9	2	5	11	0	27	?
a8	2	3	0	8	1	14	?
e1	22	4	3	22	1	52	21 (?)
e2	16	1	9	10	0	36	21 (?)
e3	4	4	3	6	5	22	?
e4	0	11	8	12	2	33	?
e5	13	1	1	7	0	22	21 (?)
a1	4	2	0	19	2	27	?

? = número cromossômico não determinado

Assim como nas gerações anteriores deste experimento, foi muito difícil determinar o nível de ploidia destas plantas, baseado em análises de pontas de raiz. Não houve definição clara em nenhuma das plantas. Todas as plantas desta geração apresentaram mais quimeras que as plantas dos ciclos anteriores. Pode haver plantas triplóides, tetraplóides ou ainda alguns aneuplóides, já que foram verificadas células com os mais variados números cromossômicos. Porém, em alguns indivíduos, a tendência pareceu ser de plantas triplóides. As plantas a5, a6, e1, e2 e e5 foram as que apresentaram mais células com 21 cromossomos. Porém, estas mesmas plantas, bem como

todas as outras, tinham muitas células com números cromossômicos que variaram de 21 até 28. Poucas células tinham mais de 28 cromossomos. A planta e4 foi a que apresentou mais células com 28 cromossomos (11 células) (Tabela 11, Figura 11).

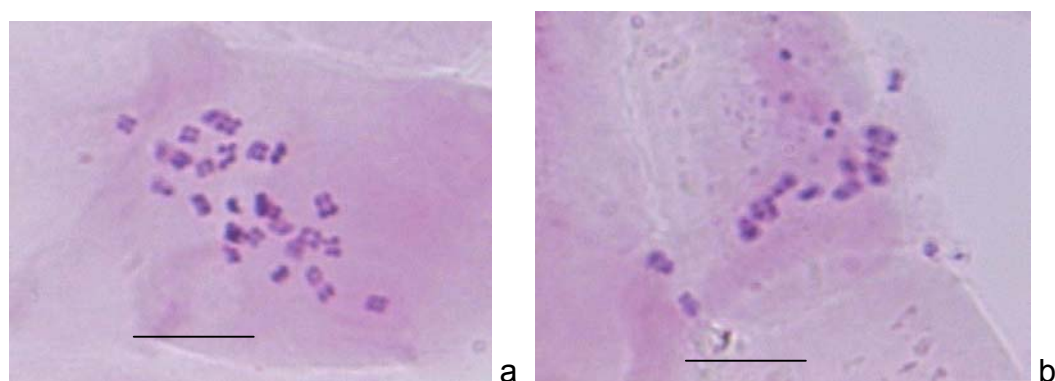


FIGURA 11 – Cromossomos da planta “e4” do quarto ciclo de seleção (Exp. 1): a) 28 cromossomos; b) menos de 28 cromossomos. Escala: 10 μm .

Observou-se, ao longo dos quatro ciclos de seleção que foram avaliados, a tendência para o aumento de raízes quiméricas conforme avançaram as gerações. No primeiro e segundo ciclos, houve mais facilidade para definir o nível de ploidia das plantas. Já no terceiro ciclo, com o aumento de quimeras nas pontas de raiz, ficou difícil saber qual foi o nível de ploidia daquelas plantas e, neste último ciclo, não foi possível determiná-lo em nenhuma das plantas. Então, as avaliações envolvendo a progênie destas plantas contradizem o argumento de Taylor & Quesenberry (1996) sobre a não ocorrência de plantas mixaplóides quando duplicadas com óxido nítrico, ao menos quando se trata de gerações subseqüentes originadas de progenitores tetraploidizados com óxido nítrico.

Becker et al. (1986) identificaram cinco indivíduos mixaplóides (no estágio de célula mãe de pólen) em 21 poliplóides de *Trifolium riograndense* induzidos quimicamente com colchicina. Segundo Sybenga (1992), em plantas tratadas com colchicina para duplicação do número cromossômico, a ocorrência de quimeras e, conseqüentemente, o surgimento de indivíduos mixaplóides é comum, porque somente células mitoticamente ativas no momento do tratamento (em pontas de raiz) têm chances de duplicar seu número cromossômico. O tecido afetado é desorganizado, conduzindo a algumas irregularidades no número cromossômico. Isto parece explicar o que ocorreu nas plantas deste experimento, apesar dos autores referirem-se à duplicação cromossômica com colchicina.

Em um grupo de plantas de *Phalaris arundinacea*, Schifino et al. (1985) observaram inúmeras irregularidades meióticas. Muitas associações univalentes e multivalentes foram constantes em células mães de pólen: pontes, cromossomos retardatários, univalentes em divisão e bivalentes com disjunção tardia foram observados na anáfase I. Também no estágio de tétrade foram encontradas muitas anormalidades. O número cromossômico variou em células mãe de pólen (CMP), geralmente sendo mais alto que 30 (normal=28). Para evitar as dificuldades das amostras de CMP, pontas de raiz foram analisadas, mas diferenças no número cromossômico também foram verificadas. Os autores discutiram que redução somática e variação no nível de ploidia ou aneuploidias entre células do mesmo indivíduo é mais comum em híbridos ou em anfiplóides induzidos. Além disso, pré-tratamentos químicos utilizados para aumentar o nível de ploidia não pareceram ser a causa da

ocorrência das anormalidades em pontas de raiz; eles somente aumentam um processo que ocorre naturalmente.

Taylor & Giri (1983) observaram a ocorrência de gametas femininos não reduzidos em trevo vermelho analisando a descendência dos cruzamentos $2X - 4X$. Metade dos tetraplóides produzidos exibiram aneuplóides com 27, 29 ou 30 cromossomos. A estimativa da frequência de produção de oosferas $2n$ foi de um a 1500 até um para cada 11000 flores.

Taylor & Berger (1989) obtiveram, na progênie tetraplóide de cruzamentos $2X - 4X$ de trevo vermelho, plantas com 27, 28, 29 e 30 cromossomos, e na progênie dos cruzamentos $4X - 2X$, plantas com 21, 22, 27, 28, 29 e 30 cromossomos. O número cromossômico foi determinado por análises de pontas de raiz.

Nesta geração, como nas anteriores, apesar de os grãos normais e os grãos gigantes estarem distintos (Tabela 10), ficou difícil determinar a categoria dos grãos, pois houve uma mistura de formas e tamanhos. As altas porcentagens de grãos inviáveis e diferenças nos tamanhos dos grãos encontradas em cada flor analisada confirmam que estas plantas são originadas de progenitores com diferentes níveis de ploidia.

4.2.5.2. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes

A Tabela 12 apresenta os cruzamentos que foram realizados nas plantas que floresceram neste último ciclo de seleção.

TABELA 12- Produção de sementes dos cruzamentos manuais realizados em plantas de trevo vermelho no quarto ciclo de seleção (Exp 1).

Planta-mãe X pólen	Nº flores polinizadas	Nº sementes coletadas	% de flores que produziram sementes*
a1 X a4	14	13	92,86
a1 X e2	15	5	33,33
a1 X a6	10	13	130,0
a2 X a4	20	5	25,0
a 2 X e2	15	5	33,33
a2 X a1	17	16	94,12
a2 X e2	20	9	45,0
a4 X e2	20	12	60,0
a4 X a2	18	15	83,33
a6 X a4	28	4	14,28
a6 X a1	20	1	5,0
e2 X a1	12	8	66,67
e2 X a2	19	16	84,21
e2 X a2	10	14	140,0
e2 X a6	25	9	36,0
a1 X ?	NP	2	-
a1 X ?	NP	8	-
a2 X ?	NP	11	-
a2 X ?	NP	12	-
a2 X ?	NP	3	-
Total	263	145+36 (NP)	Média = 55,04

?= sem controle do pai

NP= não polinizada

* em relação ao número de flores polinizadas

Neste ciclo, foram realizadas mais polinizações que nos demais: 15 inflorescências e 263 flores foram polinizadas. Como consequência, foram obtidas mais sementes. Porém, em porcentagem de flores que produziram sementes, ocorreu uma pequena diminuição, quando comparada com a porcentagem da geração anterior (terceiro ciclo). Trinta e seis sementes foram coletadas sem ter ocorrido polinizações manuais e, em uma inflorescência da planta “e2” e em uma da planta “a1”, foram coletadas mais sementes do que o número de flores polinizadas. Estes dados confirmam a possibilidade da quebra do sistema de auto-incompatibilidade ou a presença de algum inseto polinizador na casa de vegetação.

4.2.6. Análises gerais do Experimento 1

Pelos dados coletados de produção de sementes, observou-se um aumento na produção de sementes nos três primeiros ciclos de seleção deste experimento. No primeiro ciclo, envolvendo os pais 4X – 2X, apenas 6,56% das flores produziram sementes. No segundo ciclo, houve uma produção de 21,68%; no terceiro ciclo, a produção de sementes foi de 83,87% e no quarto ciclo, foi de 55,14%.

Na primeira, segunda e terceira gerações, o número de sementes diminuiu, mas houve aumento na porcentagem de produção.

A comparação nos dois últimos ciclos ficou mais difícil, porque no terceiro houve somente dois cruzamentos e no quarto, houve muito mais polinizações, mas percebe-se uma pequena queda na produção de sementes, que pode ser atribuída a fatores ambientais.

A capacidade de produzir mais sementes conforme avançam as gerações pode ter ocorrido porque as plantas sobreviventes foram selecionadas naturalmente para o aumento da estabilidade meiótica, produzindo mais gametas viáveis do que as plantas das primeiras gerações. Mas, observando as Tabelas 6, 8 e 10, onde está apresentada a viabilidade do pólen das plantas do segundo, terceiro e quarto ciclos, não se percebe uma diminuição aparente da porcentagem de grãos de pólen inviáveis. Então, a maior capacidade competitiva de gametas viáveis sobre os gametas inviáveis, devido ao aumento da força seletiva na competição com o tubo polínico e uma intensa pressão de seleção no momento da fertilização, poderia explicar a maior eficiência na produção de sementes nas duas últimas gerações.

Giri et al. (1983) tetraploidizaram com óxido nítrico uma população de trevo vermelho e examinaram comportamento meiótico, número cromossômico, viabilidade de pólen e fertilidade de plantas para verificar se a frequência de aneuploidias e irregularidades mudavam ao longo de seis gerações. A frequência de aneuplóides foi similar na primeira, terceira e sexta gerações (42,3%, 46%, 39%, respectivamente). A meiose não mostrou significantes diferenças entre a primeira e sexta gerações. O pólen mostrou-se mais estável nos euplóides e houve maior produção de sementes em cruzamentos envolvendo euplóides somente do que os que envolveram euplóides X aneuplóides. Os autores concluíram que: 1) tais cruzamentos, sem seleção, durante as sucessivas gerações de aumento de produção de sementes, é ineficaz para eliminar aneuplóides; 2) seis gerações de cruzamentos ao acaso não foram suficientes para mudar as configurações meióticas, estabilidade do pólen e produção de sementes; 3) a seleção direta para altas produções de sementes pode ser mais efetiva do que seleção para ausência de aneuplóides.

Comparando os dados destes autores citados com os dados deste experimento, notaram-se semelhanças: quatro gerações também não foram suficientes para eliminar mixaplóides e possíveis aneuplóides, já que o nível de ploidia das plantas das últimas gerações não foram bem definidas devido às quimeras, não descartando a hipótese de ocorrência de aneuplóides nestas gerações. Também não houve mudança na estabilidade do pólen, permanecendo altos índices de grãos inviáveis desde a segunda até a última geração.

Deve-se salientar que o pequeno tamanho das amostras neste experimento, com poucas plantas obtidas em cada ciclo e casos em que foram feitas poucas polinizações, prejudicou a análise dos dados, podendo comprometer a discussão e conclusão dos resultados. Ainda assim, pode-se afirmar que os triplóides podem ser úteis na geração de plantas com níveis mais altos de ploidia (Taylor & Wiseman, 1987).

4.3. Experimento 2

4.3.1. Primeiro ciclo de seleção

4.3.1.1. Análises dos grãos de pólen e seleção de plantas

No total, foram avaliadas 144 plantas das três cultivares utilizadas neste experimento (Quiñiqueli, Keenland e Redland). Destas, 53 (36,80% da população total) produziram, no mínimo, 1% de grãos de pólen gigantes e foram selecionadas para realização de cruzamentos recíprocos. Os dados de frequência de surgimento de grãos gigantes por flor de todas as plantas analisadas está no Apêndice 12; o resumo desta avaliação está na Tabela 13. Não há diferença, entre as três cultivares, em produzir pólen gigante. Todas apresentaram cerca da metade das plantas avaliadas com alguma frequência de grãos gigantes.

Pelo cálculo de diferencial de seleção para frequência de produção de pólen gigante, feito para as três cultivares independentemente, notou-se um aumento na frequência nas três populações selecionadas em relação às populações originais. Na cultivar Quiñiqueli, a população original produziu uma

TABELA 13 - Número de plantas produtoras de pólen gigante nas três populações diplóides de trevo vermelho avaliadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 2).

População*	Nº plantas analisadas	Nº plantas produtoras de pólen gigante (%)		
		0%	Menos de 1%	1% ou mais
Q	78	34 (43,59%)	24 (30,77%)	20 (25,64%)
R	41	18 (43,90%)	3 (7,32%)	20 (48,78%)
K	25	12 (48,0%)	0	13 (52,0%)

*Q= cultivar Quiñiqueli;
R=cultivar Redland;
K=cultivar Keenland;

média de 0,98% de grãos maiores e a população selecionada produziu em média 3,57% de grãos gigantes. O diferencial de seleção foi de 2,59% de aumento de produção, com um ganho de seleção realizado de 264,28%. Na população original da cultivar Redland, a produção média foi de 2,02% e a produção na população selecionada foi de 4,12%; um ganho de 103,96%, com diferencial de seleção de 2,1%. Na população original da cultivar Keenland, 2,02% também foi a média, e 3,87% foi a média de produção da população selecionada. Isto representou um ganho de seleção realizado de 91,58%, com diferencial de seleção de 1,85%. Estes dados confirmam que, assim como ocorreu na primeira geração do Experimento 1, foi possível conseguir populações melhoradas com mais altas freqüências de produção de grãos de pólen gigantes já no primeiro ciclo de seleção.

Da cultivar Quiñiqueli, foram avaliadas 78 plantas e selecionadas 20 (25,64% da população original desta cultivar) (Tabela 14). Os grãos gigantes foram, em média, 27,09% maiores que os grãos normais medidos, com variação de 12,38 a 38,84% entre as plantas.

A cultivar Redland teve 41 plantas avaliadas e 20 delas foram selecionadas (48,78% da população original avaliada) (Tabela 14), com

TABELA 14 – Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, número e porcentagem de produção de grãos gigantes das plantas selecionadas das cultivares Q (Quiñiqueli), R (Redland) e K (Keenland) no primeiro ciclo (Exp. 2).

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	% aumento do tamanho dos grãos gigantes**	Nº grãos gigantes	% ocorrência de grãos gigantes
Q25	56,98 - 53,38	64,03-61,86	12,38	65	4,33
Q26	49,73 - 43,43	65,75-64,05	13,34	49	3,27
Q54	51,32 - 46,87	64,74-62,46	16,33	63	4,2
Q61	51,88 - 48,74	65,38-63,49	16,53	34	2,27
Q115	56,98 - 54,29	66,25-62,41	19,08	29	1,93
Q122	51,32 - 47,30	63,58-61,28	23,44	34	2,27
Q159	52,74 - 48,31	62,80-60,05	23,88	32	2,13
Q175	50,794 - 47,73	66,28-64,13	24,94	56	3,73
Q176	48,01 - 44,29	66,65-64,35	26,03	50	3,33
Q178	56,46 - 53,04	65,79-62,78	26,14	56	3,73
Q194	58,14 - 48,31	65,90-63,75	29,95	76	5,07
Q274	53,75 - 49,75	66,35-64,01	30,49	69	4,6
Q296	48,87 - 45,43	65,51-63,79	30,63	39	2,6
Q297	49,17 - 45,43	64,50-61,77	30,65	46	3,07
Q325	52,03 - 48,74	67,90-65,75	31,19	73	4,87
Q337	53,04 - 49,45	66,26-64,31	31,33	65	4,33
Q346	51,17 - 47,73	66,50-63,64	32,22	45	3,0
Q352	48,87 - 45,00	66,65-64,22	34,05	59	3,93
Q358	50,59 - 43,15	66,44-64,39	36,39	63	4,2
Q373	51,02 - 47,73	66,65-64,50	38,84	68	4,53
Médias	52,14 - 47,90	65,69-63,35	26,39	53,55	3,57

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

** a porcentagem de aumento foi calculada com base no comprimento dos grãos de pólen.

...continuação

TABELA 14 – Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, número e porcentagem de produção de grãos gigantes das plantas selecionadas das cultivares Q (Quiñiqueli), R (Redland) e K (Keenland) no primeiro ciclo (Exp. 2).

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	% aumento do tamanho dos grãos gigantes**	Nº grãos gigantes	% ocorrência de grãos gigantes
R1	51,88-48,59	66,52-64,50	28,23	32	2,13
R3	51,02-47,45	67,40-65,04	32,11	66	4,4
R4	53,04-49,02	64,37-61,28	21,37	73	4,87
R5	50,89-47,73	65,21-63,36	28,14	54	3,6
R11	51,02-46,59	65,90-64,07	29,16	74	4,93
R14	54,83-52,14	63,92-60,35	16,58	90	6,0
R27	51,32-48,74	64,22-62,07	25,14	35	2,33
R32	51,60-48,59	71,92-69,21	39,37	113	7,53
R34	49,30-46,16	65,79-63,36	33,46	37	2,47
R49	49,73-46,16	66,37-63,64	33,46	47	3,13
R52	49,30-47,73	63,06-60,35	27,91	51	3,4
R55	52,74-49,17	68,11-65,27	29,16	89	5,93
R56	49,45-46,44	65,64-62,93	32,73	61	4,07
R59	58,54-54,24	66,74-62,89	14	70	4,67
R60	51,45-48,01	65,75-64,05	27,8	88	5,87
R61	53,28-49,15	66,03-63,38	23,92	83	5,53
R62	51,02-47,88	66,50-64,80	30,34	21	1,4
R72	50,44-47,45	65,10-62,95	29,07	55	3,67
R87	53,32-49,60	64,37-62,61	20,72	47	3,13
R108	50,74-46,72	64,76-62,97	27,63	49	3,27
Médias	51,75 - 48,38	65,88-63,45	27,51	61,75	4,12

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

** a porcentagem de aumento foi calculada com base no comprimento dos grãos de pólen.

...continuação

TABELA 14 – Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, número e porcentagem de produção de grãos gigantes das plantas selecionadas das cultivares Q (Quiñiqueli), R (Redland) e K (Keenland) no primeiro ciclo (Exp. 2).

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	% aumento de tamanho dos grãos gigantes**	Nº grãos gigantes	% ocorrência de grãos gigantes
K5	53,17-50,03	65,42-62,78	23,05	46	3,07
K17	50,74-46,72	66,37-64,65	30,8	54	3,6
K45	47,15-49,30	67,77-65,53	43,74	85	5,67
K49	51,32-46,59	64,76-61,81	26,19	44	2,93
K52	50,05-46,53	63,58-60,97	27,01	34	2,27
K75	50,31-46,59	67,14-64,78	33,45	65	4,33
K77	52,03-48,01	66,33-64,18	27,47	83	5,53
K78	55,19-53,04	61,60-57,96	11,61	42	2,8
K86	51,60-47,60	64,80-62,87	25,58	69	4,6
K87	52,20-48,98	63,15-64,35	20,96	35	2,33
K88	51,32-48,01	64,63-63,02	25,94	41	2,73
K92	52,61-49,02	65,47-63,0	24,44	53	3,53
K97	51,88-48,44	66,09-64,22	25,32	108	7,2
Médias	51,50-48,37	65,16-63,09	26,58	58,38	3,89
MÉDIA GERAL	51,80-47,37	65,16-63,09	27,16	57,89	3,87

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

** a porcentagem de aumento foi calculada com base no comprimento dos grãos de pólen.

porcentagem de aumento dos grãos variando de tamanho de 14,0 a 39,37%, com média geral de 27,51%.

Da cultivar Keenland, foram 25 plantas avaliadas e 13 indivíduos selecionados (52,0% do total avaliado nesta cultivar), com grãos gigantes variando de 11,61 a 43,73% maiores que os grãos normais por planta, com a média de 26,74% (Tabela 14).

Observando os dados, vê-se que a média de aumento dos grãos gigantes foi semelhante nas três cultivares e não diferiu estatisticamente pelo teste F (Apêndice 13). Pelo teste T realizado, que considerou a medida da área dos grãos, o aumento médio dos grãos gigantes, avaliando todas as cultivares, foi de 39,6%, com desvio padrão de 0,071. Este valor foi significativamente superior a 30%, que foi o aumento mínimo esperado. Esta análise apóia dados de literatura, que afirmaram que gametas $2n$ são 30 a 40% maiores em tamanho do que os grãos normais (Hermsen, 1984b; Ramanna, 1992). Além disso, comparando o tamanho médio dos grãos gigantes desta população com os grãos medidos na população tetraplóide do Experimento 1 (Tabela 3), mais uma vez se confirma a hipótese de que estes podem ser não reduzidos.

A Tabela 15 mostra as freqüências de grãos de pólen, número e percentagem de plantas que apresentaram determinada classe de freqüência entre as plantas selecionadas.

Na cultivar Quiñiqueli, apenas 5% das plantas produziram entre um e 2% de pólen gigante, sendo a maior freqüência de plantas observadas com porcentagens de produção maiores, com mais de 3%. Porém, não houve muita variação de produção entre as plantas. A maior porcentagem de

produção nesta cultivar foi a planta Q194, com 5,07% de surgimento de grãos gigantes.

TABELA 15 - Frequências de surgimento de grãos de pólen gigantes observadas nas plantas selecionadas da população diplóide no primeiro ciclo de seleção (Exp. 2).

Nº plantas (%)	% pólen gigante
cv. Quiñiqueli	
1 (5%)	1 □ 2
5 (25%)	2 □ 3
6 (30%)	3 □ 4
7 (35%)	4 □ 5
1 (5%)	+5
Total: 20 (100%)	
cv. Redland	
1 (5%)	1 □ 2
3 (15%)	2 □ 3
6 (30%)	3 □ 4
5 (25%)	4 □ 5
3 (15%)	5 □ 6
1 (5%)	6 □ 7
1 (5%)	+7
Total: 20 (100%)	
cv. Keenland	
0	1 □ 2
5 (38,46%)	2 □ 3
3 (23,08%)	3 □ 4
2 (15,38%)	4 □ 5
2 (15,38%)	5 □ 7
1 (7,69%)	+7
Total: 13 (100%)	

Metade das plantas selecionadas da cultivar Redland apresentaram frequência de grãos gigantes entre um e 4% e a outra metade dos indivíduos apresentou frequências superiores a 4%, sendo o máximo de 7,53% da planta R32.

Todas as plantas selecionadas da cultivar Keenland tiveram mais de 2% de pólen gigante, sendo 38,46% delas com porcentagens de surgimento de

grãos gigantes entre dois e 3%. Uma planta, K97, teve a maior frequência, 7,2% de produção de grãos maiores.

A análise estatística que comparou as três cultivares para porcentagem de produção de grãos gigantes não diferiu pelo teste F a 5% de probabilidade (Apêndice 14), embora tenha sido encontrada variação entre flores de um mesmo indivíduo e entre as plantas (Apêndice 12 e Tabela 14). Como foi discutido no Experimento 1, esta variação pode ser atribuída a fatores ambientais, não deixando também de destacar a variabilidade intrínseca de cada indivíduo. A média geral das três cultivares foi de 3,87%, e a média de cada cultivar foi: 3,57% (cultivar Q), 4,16% (cultivar R) e 3,89% (cultivar K). Estes dados mostram que qualquer uma das três cultivares pode ser utilizada para avaliações e seleção de plantas produtoras de gametas não reduzidos.

No Apêndice 15 encontram-se os dados referentes aos limites nos tamanhos dos grãos de pólen normais e gigantes avaliados nesta população.

Parrott & Smith (1984) avaliaram seis cultivares de trevo vermelho (100 plantas de cada cultivar) para produção de grãos de pólen não reduzidos. Selecionaram 18 plantas produtoras de, no mínimo, 1% de pólen $2n$. Em cada cultivar, o número de plantas selecionadas foi o seguinte: cv. Arlington: quatro plantas; cv. Chesapeake: uma planta; cv. Florex: cinco plantas; cv. Kenstar: uma planta; cv. Pennscott: cinco plantas e cv. Redman: duas plantas. O alcance de produção das plantas selecionadas foi de um até 84%. Este alto índice foi verificado na planta denominada C-51 (cv. Chesapeake) que, após análises meióticas, foi considerada um mutante sináptico, por ter produzido quase que exclusivamente grãos de pólen não reduzidos.

Muitos trabalhos com o gênero *Leucaena* mostraram o aparecimento de grãos de pólen gigantes em espécies diplóides, com até 12% de ocorrência no total das amostras de pólen analisadas (Schifino-Wittmann & Simioni, 1999; Schifino-Wittmann et al., 2000). Em híbridos tetraplóides entre *Leucaena leucocephala* X *L. diversifolia*, verificou-se até 4,30% de grãos de pólen não reduzidos (Schifino-Wittmann et al., 1997). Em outra investigação, a média entre famílias híbridas das mesmas espécies variou de 0,58 até 12,12%, e plantas individuais apresentaram até 29,77 e 29,82% de grãos gigantes (Schifino-Wittmann & Simioni, 1998).

Bretagnolle (2001) registrou a ocorrência de plantas produtoras de pólen $2n$ em três populações naturais de *Anthoxanthum alpinum*. A porcentagem de plantas produtoras foi de 9, 9,7% e 12,3% nas populações.

Em populações de *Solanum* avaliadas para formação de pólen $2n$ e macho fertilidade, a porcentagem de genótipos que produziram pólen $2n$ entre as espécies variou de 0% (*S. guerreroense*) até 63,6% (*S. pinnatisectum*). Foi observada a ocorrência de pólen $2n$ em 11 das 12 espécies analisadas (Zlesak & Thill, 2002).

4.3.1.2. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes

Após a seleção das plantas produtoras de grãos de pólen gigantes, foram realizadas as polinizações manuais: foram polinizadas 29 plantas, 55 inflorescências e 1421 flores, com produção de 958 sementes cheias (67,42% das flores polinizadas produziram sementes) (Tabela 16, Apêndice 16). Convém salientar que alguns progenitores masculinos utilizados nestes

cruzamentos foram selecionados no ciclo um do Experimento 1. Isto ocorreu porque estas plantas estavam vivas em casa de vegetação e por isso foram utilizadas nos cruzamentos.

TABELA 16 - Produção de sementes nas plantas da população selecionada no primeiro ciclo de seleção (Exp. 2).

Planta mãe	Nº total de flores polinizadas	Nº total de sementes coletadas	% de flores que produziram sementes*
Q25	102	75	73,53
Q54	70	41	58,57
Q159	75	48	64,0
Q175	45	8	17,77
Q178	52	53	101,92
Q194	30	8	26,67
Q274	30	54	180
Q337	32	30	93,75
Q346	28	11	39,28
R1	40	26	65,0
R3	30	0	0
R4	45	22	48,49
R11	52	15	28,85
R14	135	153	113,33
R27	83	59	71,08
R49	38	31	81,58
R52	20	13	62,0
R59	67	54	80,59
R60	34	32	94,11
R61	30	16	53,33
R62	20	7	35,0
R87	30	26	86,67
K17	20	0	0
K49	85	45	52,94
K52	20	17	85,0
K69	12	2	16,67
K78	34	10	29,41
K86	74	54	72,97
K88	88	48	54,54
Totais	1421	958	Média = 67,42

* em relação ao número de flores polinizadas.

Observa-se que algumas inflorescências não produziram sementes, ou produziram poucas, em relação ao número de flores polinizadas. As médias de produção de sementes por planta mãe foram: 36,44 (cultivar Quiñiqueli), 34,92 (cultivar Redland) e 25,14 (cultivar Keenland). Em média, houve pouca variação entre as três cultivares.

Algumas sementes foram coletadas de flores que não tinham sido polinizadas: da planta Q54, foram coletadas três sementes e da planta R4, foram obtidas 55 sementes sem ter havido polinização manual. Também houve casos em que foram coletadas mais sementes do que o número de flores que haviam sido polinizadas (Apêndice 16). Isso ocorreu em algumas inflorescências de alguns indivíduos. É importante salientar que a coleta de sementes foi realizada flor a flor. Por isso, pode-se afirmar, com certeza, que cada flor produziu somente uma semente. Então, os casos de coleta de mais sementes do que o número de flores polinizadas foram devido a outros fatores que não a produção de mais de uma semente por legume.

Outras explicações foram necessárias para esses casos específicos: no caso das sementes coletadas em plantas mães não polinizadas, pode ter ocorrido quebra do sistema auto-incompatibilidade (Taylor & Smith, 1979) ou a presença de algum inseto polinizador dentro da casa de vegetação. Já nas inflorescências onde foram coletadas mais sementes do que o número de flores polinizadas, pode ter havido contaminação da quilha ou do palito utilizado para retirar o pólen da planta doadora no momento da polinização. Esses objetos podem ter encostado em alguns estigmas e o pólen presente pode ter fecundado algumas oosferas sem o controle esperado. Também pode ter

havido engano no momento das polinizações e a contagem pode ter sido errada, não relatando o exato número de flores polinizadas, apesar do grande cuidado. Na planta Q274, foram contadas 30 flores polinizadas e foram coletadas 54 sementes. Como é improvável algum engano neste caso, a autofecundação pode ser a mais razoável maneira de explicar a produção de sementes nesta planta.

4.3.2. Segundo ciclo de seleção

4.3.2.1. Análises dos grãos de pólen e seleção de plantas

Em abril de 2002, 951 sementes obtidas no primeiro ciclo foram postas para germinar. Da cultivar Quiñiqueli, foram colocadas 328 sementes em placas de petri, com germinação de 267 (81,40%); da cultivar Redland, foram 447 sementes, com germinação de 372 (83,22%) e da cultivar Keenland, foram 176 sementes, com germinação de 125 (71,02%). Na média total de sementes germinadas (764), obteve-se uma alta porcentagem de germinação, 80,34%.

Em casa de vegetação, 145 plantas adultas fizeram parte da nova população para serem submetidas às análises. Destas, 106 foram avaliadas quanto à viabilidade dos grãos de pólen e produção de grãos gigantes, sendo selecionadas 44 plantas (41,51% do total da população) que produziram um mínimo de 2% de macropólen. A porcentagem de pólen normal em geral foi alta, superior a 80%, o que era de se esperar em uma população diplóide de trevo vermelho (Tabela 17, Apêndice 17). As plantas deste ciclo foram identificadas como famílias de meio-irmãos. Foi necessário adotar uma nova

identificação para elas, com a utilização de letras, que constituíram cada tratamento (família), com a finalidade de facilitar as análises (Tabela 17).

Foram avaliadas sete plantas vindas da cultivar Quiñiqueli, 75 plantas da cultivar Redland e 24 plantas da cultivar Keenland. Destas, foram selecionadas: uma (14,28%), 30 (40%) e 13 (54,17%) plantas em cada cultivar, respectivamente.

As sementes coletadas sem polinização (denominadas “NP”) no primeiro ciclo, também foram postas a germinar: das três sementes da planta Q54, apenas uma germinou, e das 55 sementes da planta R4, 19 delas germinaram. Oito plantas adultas da mãe R4 foram analisadas para produção de pólen $2n$ e foram denominadas: R4 I1 NP, R4 I6 NP, R4 I9 NP, R4 I11 NP, R4 I13 NP, R4 I14 NP, R4 I15 NP e R4 I18 NP. Somente a planta R4 I6 NP foi selecionada por produzir 3,53% de pólen gigante. A média de suas variáveis foi inserida na Tabela 17.

Considerando a população total avaliada, a frequência de ocorrência de grãos de pólen gigante variou de zero a 51,0% entre as plantas individuais (Apêndice 17). Dez plantas não produziram grãos gigantes, incluindo três plantas oriundas de sementes não polinizadas; 36 produziram menos de 1%, incluindo quatro plantas vindas de sementes não polinizadas, e 16 plantas produziram entre um e 2% de pólen gigante. A Tabela 18 mostra as frequências de surgimento de grãos gigantes nas plantas selecionadas desta população.

TABELA 17 – Tamanho médio de grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, viabilidade do pólen e ocorrência de grãos gigantes nas plantas selecionadas no segundo ciclo do Experimento 2.

Plantas selecionadas	Identificação	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	% de aumento de tamanho dos grãos gigantes**	Nº de grãos gigantes	% de grãos gigantes	% de pólen normal	% de pólen inviável
R1 I1	A1	51,39-47,52	60,42-56,8	17,57	114	7,6	89,67	2,73
R4 I2	B5	50,80-49,30	62,57-55,5	23,15	362	24,13	64,07	11,8
R4 I3	B6	54,83-50,53	60,85-56,3	10,98	462	30,8	38,46	30,74
R4 I6 NP	NP	52,00-48,16	63,64-59,3	22,97	53	3,53	92,73	3,74
R11 I1	C12	50,68-47,58	62,57-59,8	23,46	36	2,4	95,27	2,33
R11 I3	C14	49,73-48,16	61,49-58,9	23,65	31	2,07	94,8	3,13
R11 I9	C20	50,31-47,15	61,92-58,9	23,08	36	2,4	91,4	6,2
R11 I10	C21	49,51-46,66	60,42-58,9	22,01	49	3,27	94,47	2,26
R14 I1	D22	53,28-50,03	63,21-59,8	18,64	86	5,73	90,53	3,74
R14 I2	D23	53,38-52,40	62,35-60,2	16,79	74	4,93	90,60	4,47
R14 I3	D24	52,83-51,45	61,28-58,7	15,99	52	3,47	90,27	6,26
R14 I12	D33	53,00-50,48	64,07-60,8	20,89	225	15,0	84,54	0,46
R14 I15	D36	52,98-50,37	61,28-58,1	15,66	87	5,8	90,47	3,73
R14 I19	D40	51,88-49,67	63,43-60,0	22,25	139	9,27	86,93	3,8
R14 I23	D44	50,68-49,30	61,92-58,5	22,19	34	2,27	88,0	9,73
R14 I25	D46	51,97-49,17	62,14-58,7	19,57	44	2,93	95,87	1,2
R14 I26	D47	51,11-49,82	59,77-57,2	16,95	30	2,0	95,53	2,47
R59 I1	E48	53,54-51,97	61,49-57,6	14,86	136	9,07	89,33	1,6
R59 I2	E49	50,31-48,74	61,06-58,1	21,37	36	2,4	96,33	1,27
R59 I3	E50	49,73-46,59	59,13-57,4	18,89	85	5,67	89,4	4,93
R59 I4	E51	51,88-48,74	64,93-58,9	25,15	87	5,8	93,60	0,6
R59 I8	E55	51,88-49,60	65,15-60,0	25,57	30	2,0	97,53	0,47
R59 I9	E56	53,81-49,86	64,07-58,5	19,06	55	3,66	94,8	1,54

I= irmão;

NP= planta não polinizada;

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

** a porcentagem de aumento foi calculada com base no comprimento dos grãos de pólen.

...continuação

TABELA 17 – Tamanho médio de grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, viabilidade e ocorrência de grãos gigantes nas plantas selecionadas no segundo ciclo do Experimento 2.

Plantas selecionadas	Identificação	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	% de aumento de tamanho dos grãos gigantes**	Nº de grãos gigantes	% de grãos gigantes	% de pólen normal	% de pólen inviável
R59 I11	E58	52,09-49,24	61,92-60,8	18,86	49	3,27	84,87	13,86
R60 I1	F59	50,74-49,67	61,49-59,3	21,19	44	2,93	96,33	0,74
R60 I3	F61	55,53-52,40	64,72-60,2	16,67	56	3,73	90,33	5,94
R27 I2	G69	50,16-48,59	63,86-60,8	27,30	57	3,8	94,60	1,6
R27 I9	G76	45,37-42,53	58,91-56,1	29,86	30	2,0	96,54	1,46
R27 I11	G78	56,76-50,74	65,15-59,8	14,77	765	51,0	48,46	0,54
R27 I13	G80	49,88-45,09	61,06-58,7	22,41	75	5,0	92,13	2,87
K78 I1	H85	53,26-48,44	61,28-57,8	15,06	74	4,93	91,6	3,47
K78 I4	H88	52,03-48,65	63,86-57,8	22,73	169	11,26	84,33	4,41
K86 I1	I89	52,59-51,30	63,86-58,9	21,42	109	7,27	87,73	5,0
K86 I3	I91	50,89-47,67	63,43-58,1	24,63	62	4,13	92,6	3,27
K86 I4	I92	53,17-49,67	61,49-58,9	15,65	35	2,33	96,73	0,94
K86 I8	I96	49,60-48,44	61,28-58,1	23,53	46	3,07	92,6	4,33
K88 I3	J99	53,64-48,63	61,49-57,0	14,63	123	8,2	88,07	3,73
K88 I4	J100	50,37-46,59	60,85-55,7	20,78	71	4,73	89,8	5,47
K88 I5	J101	51,23-49,45	67,30-64,5	31,34	123	8,2	49,2	42,6
K88 I6	J102	53,32-49,73	64,50-63,6	20,97	167	11,13	87,4	1,47
K88 I8	J104	51,90-49,21	66,44-60,4	28,0	53	3,87	93,66	2,47
K88 I9	J105	50,96-47,79	62,57-59,3	22,78	90	6,0	92,87	1,13
K52 I 2	O115	51,23-48,22	64,29-59,8	25,47	67	4,47	93,47	2,06
Q178 I2	Q119	54,35-50,68	64,07-59,6	17,88	301	20,07	74,53	5,4
Médias		51,83-48,99	62,56-58,91	20,75	163,63	10,91	83,43	5,25

I= irmão; NP= planta não polinizada;

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

**a porcentagem de aumento foi calculada com base no comprimento dos grãos de pólen.

A maioria das plantas selecionadas, 68,18%, produziram de dois a 6% de grãos de pólen gigantes e em alguns indivíduos foi verificada uma alta porcentagem de grãos gigantes. A planta R27 I11 (G78) apresentou a mais alta porcentagem de produção, 51%.

TABELA 18 - Frequências de surgimento de grãos de pólen gigantes observadas nas plantas selecionadas da população no segundo ciclo de seleção (Exp. 2).

Nº plantas (%)	% pólen gigante
11 (25%)	2 □ 3%
9 (20,45%)	3 □ 4%
5 (11,36%)	4 □ 5%
5 (11,36%)	5 □ 6%
1 (2,27%)	6 □ 7%
2 (4,55%)	7 □ 8%
2 (4,55%)	8 □ 9%
2 (4,55%)	9 □ 10%
3 (6,82%)	10 □ 20%
2 (4,55%)	20 □ 30%
1 (2,27%)	30 □ 40%
1 (2,27%)	+50%
Total: 44 plantas (100%)	

Nesta geração, assim como na anterior, observou-se a eficiência da seleção em busca de grãos gigantes, observando a média de produção das plantas nas três cultivares selecionadas quando comparadas às populações originais deste mesmo ciclo. As sete plantas avaliadas, vindas de sementes de plantas da cultivar Quiñiqueli apresentaram uma média de produção de 3,43% de grãos maiores e a população selecionada, representada por um único indivíduo selecionado, produziu 20,07% de grãos gigantes. O diferencial de seleção foi de 16,64% de aumento de produção, com um ganho de seleção realizado de 485,13%. Este percentual é muito alto, porém, não se deve deixar de salientar o pequeno tamanho desta amostra, pois uma única planta selecionada pode superestimar os ganhos de seleção dentro desta cultivar neste ciclo. Também, um fato que ocorreu com esta planta foi que, dos 301

grãos maiores encontrados, 227 deles estavam concentrados em uma das três flores analisadas (Apêndice 17).

Nas 75 plantas avaliadas na população original da cultivar Redland, 3,42% foi a produção média de grãos gigantes e a produção média nas 30 plantas selecionadas foi de 7,60%. Isto representou um ganho de seleção de 103,96%, com diferencial de seleção de 4,18%.

Na população original da cultivar Keenland (24 plantas), a média foi de 3,61% e a média de produção da população selecionada foi de 5,89%; o ganho de seleção realizado foi de 63,16%, com diferencial de seleção de 2,28%.

Considerando os dados das duas últimas cultivares, percebe-se um maior ganho de seleção e um maior diferencial de seleção entre as plantas da cultivar Redland.

A porcentagem de aumento dos grãos da população selecionada, considerando somente o comprimento dos grãos, não variou estatisticamente entre as 12 famílias comparadas por suas médias (Apêndice 18). Na análise realizada para verificar se os grãos maiores eram, no mínimo, 30% maiores que os grãos normais, não houve diferença, pelo teste T, entre as médias do tamanho dos grãos gigantes em comparação com os grãos normais. O aumento médio, considerando todas as plantas da população selecionada, foi de 30,9%, com desvio padrão de 0,05. Uma das causas que pode explicar esta falta de diferença neste segundo ciclo pode ser atribuída a erros de amostragem, já que os grãos medidos são escolhidos aleatoriamente. A menor diferença de tamanho encontrada em algumas amostras pode ser porque

naquelas tenha ocorrido uma maior uniformidade dos tamanhos dos grãos. As medidas de tais grãos podem ter conduzido a pouca diferença de tamanho entre grãos normais e gigantes, porém, isto não significa que estes grãos maiores não sejam não reduzidos nesta geração de avaliação. Os valores referentes a médias e amplitude de variação de tamanho dos grãos considerados normais e gigantes neste ciclo estão no Apêndice 19.

A porcentagem de produção de grãos de pólen gigantes indicou diferença estatisticamente significativa entre as famílias, pelo teste F (Apêndice 20). A complementação da análise evidenciou diferenças entre as produções médias das famílias (Tabela 19). As maiores produções foram nas famílias “B” e “Q”, que se destacaram por valores de produção médio superiores a 20%. Porém, como a família “Q” foi composta por apenas um indivíduo e a família “B”, por dois, estes valores refletem uma alta produção individual. Houve variação entre as plantas, considerando a população total, como pode ser visto pelos dados da Tabela 17, com destaque para a planta G78, da família “G”, que produziu 51% de grãos gigantes. Este valor elevou a média da família, que ficou em 15,45%. Os demais valores individuais não foram tão discrepantes, mostrando produções mais ou menos uniformes entre as plantas.

4.3.2.2. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes

Nesta etapa dos cruzamentos manuais, 29 plantas foram utilizadas com progenitores femininos, sendo polinizadas um total de 68 inflorescências e

TABELA 19 - Comparação entre as médias das 12 famílias avaliadas para porcentagem de produção de pólen gigante no segundo ciclo de seleção (Exp. 2).

Famílias (tratamentos)	% produção pólen gigante
B	27,46 a
Q	20,07 b
G	15,45 b c
H	8,09 c d
A	7,60 d
J	7,52 d e
D	5,71 e
O	4,47 e
E	4,55 e
I	4,20 e f
F	3,30 f
C	2,53 f

médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

1752 flores. Foram coletadas 975 sementes (55,65% das flores polinizadas produziram sementes) (Tabela 20, Apêndice 21). Estas fizeram parte do terceiro ciclo de seleção.

Neste ciclo, houve somente uma inflorescência, na planta Q119, onde foram coletadas mais sementes (32) do que o número de flores polinizadas (30). Este caso deve ter sido de contaminação do palito ou quilha utilizados para polinização, ou algum engano no momento de contagem do número de flores polinizadas.

O índice de porcentagem de flores que produziram sementes variou de 0 a 88,9% entre as plantas mãe polinizadas. Baixos índices de produção de sementes em algumas plantas mãe não confirmaram os dados de viabilidade do pólen, que apresentaram altos índices de produção de grãos normais.

TABELA 20 - Produção de sementes nas plantas da população selecionada no segundo ciclo de seleção (Exp. 2).

Planta mãe	Nº total de flores polinizadas	Nº total de sementes coletadas	% de flores que produziram sementes*
A1	75	61	81,53
B5	20	5	25,0
B6	75	45	65,0
C14	65	33	50,77
C20	60	46	76,67
D22	50	28	56,0
D24	40	32	80,0
D36	50	9	18,0
D40	90	26	28,89
D47	20	17	85,0
E48	145	85	58,62
E50	209	76	36,36
E55	25	15	60,0
F59	30	11	36,67
F61	56	26	46,43
G69	42	37	88,09
G76	86	70	81,39
G78	63	16	25,39
G80	50	25	50,0
H88	60	39	65,0
I89	18	0	0
I92	35	20	57,14
J99	65	38	58,46
J100	76	65	85,53
J102	35	20	57,14
J104	41	28	68,29
J105	28	21	75,0
Q119	85	56	65,88
Totais	1752	975	Média = 55,65

*em relação ao número de flores polinizadas.

4.3.3. Terceiro ciclo de avaliações e seleção

4.3.3.1. Análises dos grãos de pólen e seleção de plantas

Em abril de 2003, 947 sementes foram postas para germinar. No total, 750 germinaram (germinação de 79,19% das sementes).

Neste último ciclo, mais de 500 plantas foram estabelecidas em casa de vegetação e se tornaram adultas.

No Apêndice 22, estão listadas as 200 plantas analisadas, a porcentagem de produção de grãos gigantes em cada uma delas e em cada flor individual avaliada, e a porcentagem de viabilidade dos grãos de pólen. Em 39 plantas, não foi registrado nenhum grão de pólen não reduzido; entre zero e 1% de produção de grãos gigantes foi observado em 78 plantas; entre um e 2% foi registrado em 18 plantas e entre dois e 3% foi verificado em 10 plantas. Em 55 plantas, a porcentagem de ocorrência de grãos gigantes variou de três até 46,73% e estas plantas foram selecionadas para os cruzamentos recíprocos (Tabela 21).

Das plantas descendentes da cultivar Quiñiqueli, foram analisadas 20 e selecionadas sete (35%). No ciclo anterior, foi selecionada apenas uma planta desta cultivar, que produziu 20,07% de grãos maiores. Sua descendência selecionada produziu, em média, 5,76% de pólen gigante. A capacidade desta progênie em produzir macropólen em altas frequências não repetiu, provavelmente devido às flutuações das condições ambientais.

Da cultivar Redland, foram analisadas 131 plantas e selecionadas 40 (30%). Na descendência da cultivar Keenland, 49 plantas foram analisadas e oito delas (16,32%) foram selecionadas para produção de macropólen.

Neste ciclo, apesar das progênies apresentarem-se com números diferentes, notou-se que a habilidade das plantas vindas da cultivar Keenland em produzir grãos gigantes sofreu uma queda, quando comparada com os ciclos anteriores. Porém, deve-se salientar que, mesmo com poucas plantas selecionadas, a progênie desta cultivar foi a que apresentou os maiores índices

TABELA 21 – Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, viabilidade do pólen e ocorrência de grãos gigantes nas plantas selecionadas no terceiro ciclo do Experimento 2.

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	% aumento de tamanho dos grãos gigantes**	Nº de grãos gigantes	% de grãos gigantes	% de grãos normais	% de grãos inviáveis
A1-6	50,65-49,69	65,64-58,91	29,58	73	4,87	91,2	3,93
B6-8	52,25-51,17	70,09-56,98	34,16	51	3,4	82,6	14,0
C20-4	48,31-47,15	62,78-60,91	29,95	51	3,4	93,4	3,2
D22-11	52,68-50,74	71,81-67,73	36,32	50	3,33	93,53	3,14
D22-13	53,04-52,46	62,65-59,73	18,26	88	5,87	90,87	3,26
D40-3	50,35-49,45	60,85-57,62	20,84	83	5,53	88,53	5,94
D40-9	46,29-44,57	64,07-61,49	38,41	135	9,0	57,8	33,2
D40-16	55,19-52,89	64,35-61,77	16,59	61	4,07	60,67	35,26
D40-18	49,45-48,01	64,76-62,65	30,95	102	6,8	89,53	3,67
D47-2	53,47-50,89	68,22-65,79	27,58	250	16,67	82,2	1,13
E48-11	51,60-50,42	63,21-60,91	22,5	219	14,6	76,07	9,33
E48-15	54,29-52,61	61,21-58,20	12,75	48	3,2	93,87	2,93
E48-16	53,17-52,18	67,73-65,79	27,38	90	6,	91	3,0
E48-28	51,75-50,46	62,20-58,63	20,19	47	3,13	93,4	3,47
E48-33	54,46-52,18	70,80-60,48	30	137	9,13	88,27	2,6
E48-44	47,30-46,44	59,77-56,33	26,36	75	5,0	93,6	1,4
E48-47	54,03-52,46	70,09-65,64	29,72	244	16,27	71,13	12,6
E48-48	53,75-52,18	66,93-65,36	24,52	112	7,47	91,07	1,46
E48-52	50,03-48,59	64,78-62,78	29,48	55	3,67	91,53	4,8
E48-54	50,89-47,73	69,40-64,65	36,75	67	4,47	90,67	4,86
E48-69	53,32-50,37	59,13-57,62	10,88	45	3,0	91,53	5,47
E48-70	49,24-47,52	68,52-65,79	39,17	468	31,2	66,87	1,93
E48-73	51,39-50,10	62,57-59,99	21,76	52	3,47	54,27	42,26
E50-6	53,04-51,17	62,78-56,61	18,37	51	3,4	87,34	9,26
E50-17	53,54-52,03	65,36-62,78	22,09	57	3,8	92,6	3,6
E50-28	50,89-50,16	60,85-59,13	19,56	47	3,13	93,87	3,0
E55-10	51,45-49,02	61,64-57,53	19,81	52	3,47	88,2	8,33
E55-13	51,75-50,16	62,35-59,06	20,48	46	3,07	91,33	5,6
E55-15	52,89-51,60	60,85-57,19	15,04	53	3,53	91,34	5,13
E55-31	52,76-51,60	61,77-58,20	17,07	53	3,53	66,87	29,6
E55-32	49,30-48,01	59,81-57,86	21,32	86	5,73	92,2	2,07

* as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

** a porcentagem de aumento foi calculada com base no comprimento dos grãos de pólen.

...continuação

TABELA 21 – Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes, porcentagem de aumento, viabilidade do pólen e ocorrência de grãos gigantes nas plantas selecionadas no terceiro ciclo do Experimento 2.

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	% aumento dos grãos gigantes**	Nº de grãos gigantes	% de grãos gigantes	% de grãos normais	% de grãos inviáveis
F61-14	50,03-48,74	64,50-59,06	28,92	45	3,0	95,33	1,67
F61-15	53,75-52,61	65,36-61,77	21,6	210	14,0	80,54	5,46
G69-3	51,17-49,02	67,66-61,64	32,23	91	6,07	91,87	2,06
G69-9	52,46-50,89	68,16-59,77	29,92	110	7,33	88,4	4,27
G69-24	55,19-52,46	72,09-68,22	30,62	192	12,8	86,73	0,47
G76-16	51,82-48,44	63,06-57,62	21,7	59	3,93	90,07	6,0
G78-2	56,76-53,32	62,22-60,20	9,62	701	46,73	46,73	6,54
G78-5	52,03-51,39	63,79-60,48	22,6	524	34,93	33,67	31,4
G78-15	50,16-48,44	61,64-56,27	22,89	49	3,27	95,2	1,53
H85-10	52,89-51,88	64,78-57,90	22,48	223	14,87	79,47	5,66
J99-14	59,34-56,05	70,24-66,37	18,37	421	28,07	69,67	2,26
J100-2	53,32-51,75	58,91-57,19	10,48	169	11,27	84,6	4,13
J100-30	50,46-48,16	61,64-57,19	22,16	47	3,13	92,93	3,94
J100-32	53,90-52,59	63,17-59,66	17,16	56	3,73	90,93	5,34
J100-35	53,47-50,59	63,06-53,75	17,93	134	8,93	88,07	3,0
J100-37	52,31-51,30	67,66-64,78	29,35	91	6,07	84,46	9,47
J104-4	49,45-48,74	60,48-59,62	22,3	88	5,87	78,93	15,2
Q119-7	51,60-48,59	64,78-59,34	25,54	47	3,13	96	0,87
Q119-9	50,74-49,02	64,22-58,91	26,57	61	4,07	83,67	12,26
Q119-11	48,27-49,06	69,66-62,52	44,32	52	3,47	74,6	21,93
Q119-14	51,88-49,82	60,20-57,19	16,04	45	3,0	87,33	9,67
Q119-17	51,45-50,46	62,07-56,48	20,64	101	6,73	91,07	2,2
Q119-24	55,04-51,75	63,36-57,34	15,12	91	6,07	91	2,93
Q119-28	52,89-50,03	70,09-59,62	32,52	208	13,87	82,2	3,93
Médias	52,05-50,35	64,54-60,31	24,16	124,78	8,32	83,83	7,85

* as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

** a porcentagem de aumento foi calculada com base no comprimento dos grãos de pólen.

de ganhos de seleção e diferencial de seleção para produção de grãos maiores dentro das plantas.

Na Tabela 22 está a freqüência de ocorrência de grãos gigantes nas plantas selecionadas.

TABELA 22 - Freqüências de surgimento de grãos de pólen gigantes observadas nas plantas selecionadas da população do terceiro ciclo de seleção (Exp. 2).

Nº plantas (%)	% pólen gigante
23 (41,82%)	3 □ 4
4 (7,27%)	4 □ 5
5 (9,09%)	5 □ 6
6 (10,90%)	6 □ 7
2 (3,64%)	7 □ 8
1 (1,82%)	8 □ 9
2 (3,64%)	9 □ 10
8 (14,54%)	10 □ 20
1 (1,82%)	20 □ 30
2 (3,64%)	30 □ 40
1 (1,82%)	+40
Total: 55 (100%)	

Nesta geração, pôde-se verificar que quase 50% das plantas selecionadas produziram até 5% de grãos gigantes. Em doze plantas houve produção de mais de 10%. Naqueles indivíduos em que foram verificadas porcentagens de produção superior a 20%, plantas G78-2, G78-5, J99-14 e E48-70, análises complementares de contagem cromossômica em pontas de raiz foram realizadas para verificar se estas plantas eram mesmo diplóides ou se alguma progênie poliplóide havia surgido nesta população. Porém, dados de contagem confirmaram a condição diplóide destes indivíduos. Nenhuma anormalidade foi verificada nestas análises.

Apesar do baixo número de sementes tetraplóides encontradas nos cruzamentos 2X – 4X em trevo vermelho, Taylor & Giri (1983) concluíram que

algum clone das plantas diplóides produziu megásporos e/ou micrósporos não reduzidos e mais, o surgimento de plantas tetraplóides comprovaram que o pólen monoplóide, em alguns casos, é excluído na competição com o pólen diplóide.

Parrott & Smith (1986c) encontraram duas plantas tetraplóides em cruzamentos $2X - 2X$, entre plantas selecionadas por produzirem grãos de pólen gigantes. Os autores concluíram que a poliploidização sexual bilateral foi a explicação mais provável para a origem destes tetraplóides.

Como já relatado na Revisão Bibliográfica, Parrott et al. (1985) tentaram obter plantas poliplóides em cruzamentos bilaterais $2X - 2X$ em trevo vermelho, sem realizar seleção para plantas produtoras de oosferas $2n$. Apenas o progenitor masculino foi selecionado por produzir alta porcentagem de pólen gigante (estudo prévio realizado por Parrott & Smith, 1984), e foi utilizado nos cruzamentos. Uma planta triplóide e quatro plantas tetraplóides, representando 13% do total de sementes coletadas, que foi de 57, foram obtidas. Os autores estimaram que a frequência de oosferas não reduzidas foi de 0,138 para cada 1000 flores polinizadas. Mesmo sem seleção de genitores femininos, plantas tetraplóides surgiram neste experimento. Os autores comentaram que poliploidização sexual bilateral pode ser uma fonte de tetraplóides em trevo vermelho.

Nesta geração, 18 famílias de meio-irmãos constituíram os tratamentos. Não houve diferença estatisticamente significativa para porcentagem de aumento dos grãos de pólen. Para porcentagem de produção de grãos maiores, houve diferença entre as médias das famílias (Apêndice 24).

A complementação da análise, comparando as médias, está na Tabela 23. As plantas da família G78 produziram a mais alta porcentagem de grãos gigantes (28,31%). Estas vieram da mãe G78 do ciclo dois que, como já foi comentado, produziu 51% de grãos gigantes naquele ciclo. Neste, sua descendência confirmou a alta capacidade desta família em produzir macropólen. A família J99 foi representada por apenas uma planta selecionada nesta geração, mas esta apresentou, juntamente com a família G78, a mais alta produção de pólen gigante (28,07%). Neste último ciclo, variações individuais também ocorreram (Tabela 21 e Apêndice 22).

TABELA 23 - Comparação entre as médias das 18 famílias avaliadas para porcentagem de produção de pólen gigante no terceiro ciclo de seleção (Exp. 2).

Famílias (tratamentos)	% produção pólen gigante
G78	28,31 a
J99	28,07 ab
D47	16,67 bc
H85	14,87 cde
G69	8,73 cde
E48	8,51 cde
F61	8,50 def
J100	6,62 ef
D40	6,35 ef
J104	5,87 ef
Q119	5,76 ef
A1	4,87 efg
D22	4,60 efg
G76	3,90 fg
E50	3,44 fg
B6	3,40 fg
C20	3,40 fg
E55	2,52 g

médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

A produção de grãos de pólen normais em geral foi alta, com valores superiores a 80% na maioria das plantas. Em duas plantas onde foram encontradas as mais baixas produções de pólen normal, G78 –2 e G78 – 5, foram as que apresentaram a maior produção de grãos gigantes, 46,73% e 34,93%, respectivamente (Tabela 21). A alta produção de macropólens nas plantas da família G78 elevou sua média e colocou-a na primeira posição para porcentagem de produção de grãos gigantes, como já foi verificado.

No Apêndice 25 estão os limites de tamanho dos grãos encontrados em cada planta avaliada.

O teste estatístico T, realizado para verificar a porcentagem mínima de aumento dos grãos, detectou diferença no aumento mínimo de 30% dos grãos maiores sobre os normais nesta última geração. A média geral da população foi 32% de aumento, com desvio de 0,07. Nesta geração, repetiu-se o que ocorreu com a primeira: os grãos maiores medidos foram, no mínimo, 30% maiores, confirmando a não redução desses grãos nesta geração.

Os cálculos de ganhos de seleção e diferencial de seleção detectaram o aumento na freqüência de produção de grãos gigantes nas plantas da população selecionada, quando comparadas com as plantas da população original deste ciclo.

Na cultivar Quiñiqueli, a média de produção de grãos maiores foi de 5,76% na população selecionada e 2,39% na população original. O

diferencial de seleção foi de 3,37% de aumento de produção, com um ganho de seleção realizado de 141,0%.

Em 131 plantas avaliadas na população original da cultivar Redland, 3,0% foi a produção média de grãos gigantes e 8,38% foi a média de produção das 40 plantas selecionadas. O diferencial de seleção foi de 5,38% e o ganho de seleção foi de 179,33%.

Nas 49 plantas da população original da cultivar Keenland, a média de produção de grãos gigantes foi de 2,04%, e a média de produção da população selecionada foi de 10,24%. Com já foi comentado anteriormente, esta foi a cultivar que apresentou os maiores índices de ganho de seleção realizado (401,96%) e diferencial de seleção (8,2%), quando comparadas com as demais cultivares. Neste último ciclo, a sua progênie seria a mais indicada para continuar o processo de avaliações e seleção em busca de maiores produções de gametas não reduzidos.

4.3.3.2. Cruzamentos recíprocos e produção de sementes

Nesta etapa, foi possível realizar polinizações em 28 plantas mãe, 82 inflorescências e 2046 flores (Apêndice 26, Tabela 24).

Neste ciclo, a produção de sementes também variou entre as plantas, de 5% até 113,33%. Analisando individualmente cada inflorescência (Apêndice 26), observaram-se casos em que foram coletadas mais sementes do que o número de flores polinizadas, justificando as porcentagens superiores a 100% de produção de sementes. Aqui, novamente, as explicações se baseiam na possível quebra do sistema de auto-incompatibilidade e/ou

presença de insetos polinizadores na casa de vegetação. Em casos onde a diferença de número de sementes coletadas em relação ao número de flores polinizadas foi muito pequena, provavelmente ocorreu contaminação do palito ou quilha utilizados para polinização ou houve erros de anotação.

TABELA 24 - Produção de sementes nas plantas da população selecionada no terceiro ciclo de seleção (Exp. 2).

Planta mãe	Nº flores polinizadas	Nº sementes coletadas	% de flores que produziram sementes*
A1-6	80	66	82,5
D22-13	27	21	77,78
D40-3	30	12	40,0
E48-11	70	36	51,42
E48-15	10	11	110,0
E48-16	40	20	50,0
E48-28	153	65	42,48
E48-44	48	37	77,08
E48-69	60	45	75,0
E48-70	40	23	57,5
E50-6	160	58	36,25
E50-10	40	31	77,5
E50-28	26	11	42,31
E55-10	255	173	73,72
E55-13	95	39	41,05
F61-5	20	15	75,0
G69-9	55	39	86,67
G69-24	30	20	66,67
G78-2	20	1	5,0
G78-5	50	36	72,0
H85-10	20	18	90,0
J100-2	25	20	80,0
J100-30	55	34	61,82
J100-32	65	44	67,69
J104-4	207	122	58,94
Q119-9	129	104	80,62
Q119-14	30	34	113,33
Q119-17	206	95	46,11
Total	2046	1230	Média = 60,12

*em relação ao número de flores polinizadas.

As causas da ampla variação na produção de sementes podem ser explicadas pelas condições ambientais, como calor, umidade, idade do pólen,

que promovem ou não as maiores taxas de produção de sementes. Provavelmente as menores produções não são devido à menor viabilidade do pólen, já que estes foram bastante férteis, como já comentado anteriormente.

4.3.3.3. Análises gerais do Experimento 2

Na comparação de frequência de plantas produtoras de pólen gigantes em todos os ciclos, a situação foi a seguinte: no primeiro ciclo, do total de 144 plantas avaliadas, 80 delas (55,56%) produziu grãos gigantes em alguma porcentagem. Já no segundo ciclo, esta porcentagem aumentou: 96 plantas, representando 90,56% da população original (de 106 plantas), produziram gametas $2n$ e no último ciclo, o índice abaixou um pouco, em 200 plantas avaliadas, 161, ou seja, 80,5% da população original, produziram plantas com alguma porcentagem de macropólen.

As flutuações no número de plantas produtoras de grãos gigantes, ou mesmo na frequência de produção desses grãos dentro das plantas e entre as famílias pode ser atribuído ao efeito ambiental. Os distúrbios meióticos que conduzem à formação de gametas não reduzidos são influenciados pelo ambiente. Por isso, a produção de grãos de pólen gigantes variou tanto dentro das populações quanto entre os três ciclos de seleção.

Hermesen (1984a) citou que a grande influência de condições micro e macroambientais na ocorrência e frequência de gametas $2n$, na maioria dos genótipos, complica muito a análise genética. Porém, ela oferece uma possibilidade de explorar a variação ambiental para aumentar as frequências ou igualá-las, para indução de formação de gametas $2n$. O autor comentou

sobre a importância desta abordagem em programas de poliploidização sexual iniciada em culturas diplóides onde há falta de tetraplóides relacionados.

Uma outra explicação para a ampla variação na frequência de produção de pólen $2n$ encontrada é a mistura de genitores masculinos utilizados nos cruzamentos, já que nestas análises só foram consideradas as mães nos três ciclos de seleção. Isto pode ter conduzido às alterações na frequência de surgimento de pólen gigante. Também pode ter contribuído para as diferenças na porcentagem de produção de grãos gigantes, as avaliações de amostras com número variado de repetições.

A análise de variância que confrontou o desempenho geral das três famílias, considerando sua estrutura original, composta pelas cultivares Quiñiqueli, Redland e Keenland, o desempenho das famílias em cada ciclo e o progresso feito no decorrer dos três ciclos de seleção na população geral para produção de grãos gigantes está no Apêndice 27. Todas as análises foram estatisticamente significativas para esta variável. As comparações de médias estão nas Tabela 25, 26 e 27, respectivamente.

TABELA 25 – Desempenho médio das três famílias quanto à frequência de produção de grãos de pólen gigantes nas plantas selecionadas nos três ciclos de seleção do Experimento2.

Famílias	Médias de porcentagem de produção de grãos gigantes
Redland	12,66 a
Keenland	4,16 b
Quiñiqueli	2,58 b

médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

Na Tabela 25 pode ser discutido o efeito materno, já que a estrutura das famílias foi baseada nas plantas mães que originaram as sementes para serem estabelecidas no ciclo seguinte. Nesta situação, as plantas originadas

da cultivar Redland produziram as mais altas freqüências de grãos de pólen gigantes, em média.

TABELA 26 – Desempenho das famílias dentro dos três ciclos de seleção quanto à freqüência de produção de grãos de pólen gigantes nas plantas selecionadas do Experimento 2.

Famílias/ ciclos	Médias de porcentagem de produção de grãos gigantes
Família Quiñiqueli	
Ciclo um	4,20 a
Ciclo três	2,37 b
Ciclo dois	1,18 b
Família Redland	
Ciclo três	19,72 a
Ciclo dois	13,41 b
Ciclo um	4,84 c
Família Keenland	
Ciclo três	4,82 a
Ciclo dois	4,68 a
Ciclo um	2,97 a

médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

Os dados da Tabela 26 demonstram que na cultivar Quiñiqueli, a maior freqüência de produção se concentrou no ciclo um, teve uma queda de no ciclo dois e, no terceiro ciclo, aumentou um pouco. Este dado é muito interessante, porque no segundo ciclo, apenas uma planta foi selecionada e produziu 20,07% de pólen gigante. E este foi justamente o ciclo onde sua média de produção foi a menor. Isto ocorreu porque, como já foi salientado em Material e Métodos, o programa estatístico não se baseou em apenas uma repetição, mas sim, dissolveu estes valores entre as médias dos outros ciclos para realizar a análise.

Houve um progresso evidente na família da cultivar Redland, ao longo das três gerações, em produzir grãos gigantes. Esta família aumentou significativamente a produção dos grãos maiores e confirmou o avanço feito em direção ao aumento de produção desses grãos. Na descendência da família Keenland, a média de produção nos três ciclos foi semelhante, não havendo diferença nas três gerações.

Analisando estes dados, pode-se deduzir que a cultivar Redland foi a que apresentou o maior desempenho para produção de pólen $2n$, quando comparada com as demais cultivares. Além disso, nos três ciclos de seleção, eram selecionadas, no mínimo, 30% das plantas desta cultivar que produziam macropólen. Esta cultivar pode ser promissora para selecionar plantas produtoras de gametas não reduzidos e, posteriormente viabilizar a poliploidização sexual em trevo vermelho.

TABELA 27 – Frequência média de produção de grãos de pólen gigantes das plantas selecionadas nos três ciclos de seleção do Experimento 2.

Gerações	Médias de porcentagem de produção de grãos gigantes
Ciclo três	8,97 a
Ciclo dois	6,42 b
Ciclo um	4,00 c

médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

Observando os dados da Tabela 27, fica claro que houve um significativo aumento de produção em três gerações de avaliações. Tomando como base a população original do primeiro ciclo, não selecionada, cuja porcentagem média de produção foi de 1,67% e comparando com a população

selecionada do último ciclo (8,97%), houve um diferencial de seleção de 7,3% com um ganho de seleção realizado de 437,12%. Estes dados confirmam o sucesso deste programa de melhoramento realizado para aumentar a frequência de produção de grãos de pólen gigantes.

Porém, serão necessárias mais gerações de seleção e cruzamentos sexuais bilaterais para aumentar ainda mais a produção de gametas $2n$. o processo em busca de plantas com boa produção de gametas não reduzidos deverá ocorrer até que surjam os indivíduos tetraplóides esperados.

A partir destes resultados, cresce a expectativa em torno da real possibilidade de que poliplóides sexuais possam surgir em populações selecionadas de trevo vermelho, o que representa uma importante etapa para o melhoramento desta espécie.

5. CONCLUSÕES

Em relação ao Experimento 1, pode-se afirmar que os cruzamentos interploidia foram realizados com sucesso, já que a descendência apresentou plantas férteis. Estas análises comprovaram que triplóides podem ser utilizados como ponte para produção de tetraplóides, mostrando que o chamado “bloco triplóide” não é 100% eficaz. Também se confirmou a maior persistência de plantas tetraplóides em condições de casa de vegetação.

Os cruzamentos manuais realizados para produção de sementes, tanto no Experimento 1 quanto no Experimento 2, mostraram-se eficientes, pois a tendência, no decorrer das gerações, foi em direção ao aumento da produção.

Quanto ao Experimento 2, concluiu-se que as análises de detecção de grãos de pólen gigantes foram eficientes, bem como a seleção em busca de plantas selecionadas com as mais altas frequências de produção de macropólen.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, K.C.; CLEVELAND, R.W. Hybrids of *Trifolium pratense* X *Trifolium pallidum*. **Crop Sci.**, Madison, v. 10, p. 354-357, 1970.
- BARCACCIA, G.; ROSELLINI, D.; FALCINELLI, M.; VERONESI, F. Reproductive behavior of tetraploid alfafa plants obtained by unilateral and bilateral sexual polyploidization. **Euphytica**, Wageningen, v. 99, p. 199-203, 1998.
- BARCACCIA, G.; ALBERTINI, E.; ROSELLINI, D.; TAVOLETTI, S., VERONESI, F. Inheritance and mapping of 2n-egg production in diploid alfalfa. **Genome**, Ottawa, v. 43, p. 528-537, 2000.
- BARONE, A.; CARPUTO, D.; LA ROTONDA, G.; FRUSCIANTE, L. Discrepancy between spindle anomalies and 2N pollen production in *Solanum* interespecific hybrids. **Am. Potato J.**, Madison, v. 74, p. 399-403, 1997.
- BECERRA LOPEZ-LAVALLE, L.A.; ORJEDA, G. Ocurrance and cytological mechanism of 2n pollen formation in a tetraploid acession of *Ipomoea batatas* (sweet potato). **J. Hered.**, Washigton, v. 93, n.3, p. 185-192, 2002.
- BECKER, L. C. M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; PAIM, N. R.; RIBOLDI, J. Induction of polyploidy and agronomic comparison of diploid and tetraploid forms of *Trifolium riograndense* Burkart. **Rev. Bras. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 4, p. 645-657, 1986.
- BENNET, M.D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amount in angiosperms. **Ann. Bot.**, Bristol, v. 76, p. 113-176, 1995.
- BERGERVOET, J. H. W.; VERHOEVEN, H. A.; GILISSEN, L.J.W.; BINO, R.J. Highs amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pericarp. **Plant Sci.**, Limerick, v. 116, p. 141-148, 1996.
- BEUSELINCK, P.R.; STEINER, J.J.; RIM, Y.W. Morphological comparison of progeny derived from 4X-2X and 4X-4X hybridizations of *Lotus glaber* Mill. and *L. corniculatus* L. **Crop Sci.**, Madison, v. 43, p. 1741-1746, 2003.

BINGHAM, E. T. Transfer of diploid *Medicago* spp. germoplasm to tetraploid *M. sativa* L. in 4x – 2x crosses. **Crop Sci.**, Madison, v. 8, p. 760-762, 1968.

BINGHAM, E. T.; GILLIES, C.B. Chromosome pairing fertility and crossing behavior of haploids of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa* L. **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 13, p. 195-202, 1971.

BRETAGNOLLE, F. Pollen production and spontaneous polyploidization in diploid populations of *Anthoxanthum alpinum*. **Biol. J. Linn. Soc.**, Londres, v.72, p. 241-247, 2001.

BRETAGNOLLE, F. THOMPSON, J.D. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. **New Phytologist**, Oxford, v. 129, n. 1, p. 1-22, 1995.

BRIGGS, D.; WALTERS, S.M. **Plant Variation and Evolution**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 512 p. Cap. 3: Abrupt speciation.

BRODA, Z.; NAWRACALA, J.; KONIECZNY, G.; DYBA, St.; TORZ, L. Effect of selection in population obtained from 2x – 4x crosses in red clover (*Trifolium pratense* L.). In: VERONESI, F.; BULLITA, S.; CAREDDA, S. (Eds.). **Ploidy and chromosome manipulation in forage breeding**. Alghero: Eucarpia, 1991. p. 156-158.

BULLITTA, S.; SMITH, R.R. Preliminary evidence for the presence of 2n pollen in *Trifolium nigrescens* Viv. and its relevance to the evolution of *Trifolium repens* L. In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.). **Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives**. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p.67-72.

CARADUS, J.R.; WILLIAMS, W.M. Other temperate forage legumes. In: SMARTT, J.; SIMMONDS, N.W. (Eds.). **Evolution of crop plants**. 2. ed. Essex: Longman Scientific & Technical, 1995. p. 332-313.

CARDOSO, M. B.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Taxonomic and evolutionary implications of intraespecific variability in chromosome numbers of species of *Leucaena* Benth. (Leguminosae). **Bot. J. Linn. Soc. Lond.**, Londres, v. 134, p. 549-556. 2000.

CARPUTO, D.; FRUSCIANTE, L.; PELOQUIN, S. J. The role of 2n gametes and endosperm balance number in the origin and evolution of polyploids in the tuber-bearing Solanums. **Genetics**, Pittsburgh, v. 163, p. 287-294, 2003.

CHRISTIE, B.R.; CHOO, T.M. Morphological characteristics associated with winter survival of five growth types of tetraploid red clover. **Euphytica**, Wageningen, v. 54, p. 275-278, 1991.

CONICELLA, C., BARONE, A., TUCCI, M., FRUSCIANTE, L. Use of wild *Solanum* species in potato breeding via 2n gametes. In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.). **Gametes with somatic chromossome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives**. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p.31-38.

CRUZ, C.D. **Programa Genes**, versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 1 CD-ROM.

DAVIES, W.E. Host/ pollinator relationships in the evolution of herbage legumes in Britain. **Sci. Prog.**, Oxford, v. 59, p. 573-589, 1971.

DEN NIJS, T.P.M.; PELOQUIN, S.J. Polyploid evolution via 2n gametes. **Am. Potato J.**, Madison, v. 54, p. 377-386, 1977.

DE WET, J.M.M.J. Polyploid and evolution in plants. **Taxon**, Utrecht, v. 20, n.1, p. 29-35, 1971.

DEWEY, D. R. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: LEWIS (Ed.). **Polyploidy: Biological Relevance**. St Louis, Missouri: Washigton University, 1980. p. 445-467.

EL MOKADEN, H.; CREPEL, L.; MEYNET, J.; GUDIN, S. The occurrence of 2n-pollen and origin of sexual polyploids in dihaploid roses (*Rosa hybrida* L.). **Euphytica**, Wageningen , v. 125, p. 169-177, 2002.

EVANS, A. M. The production and identification of polyploids in red clover, white clover and lucerne. **New Phytologist**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 149-162, 1955.

EVANS, G.M. Polyploidy and crop improvement. **J. Agric. Soc.**, Aberystwyth, v. 62, p. 93-116, 1981.

FERGUS, E.N.; HOLLOWELL, E.A. Red clover. **Adv. Agron.**, Nova Iorque, v.12, n. 1, p. 365-436, 1960.

GIRI, N.; TAYLOR, N.L.; COLLINS, G.B. Chromossome stability and fertility of a nitrous oxide-derived tetraploid population of red clover. **Crop Sci.**, Madison, v. 23, p. 45-48, 1983.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 856 p. Cap. 9: Mutação cromossômica II: alterações numéricas.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. On Ö Winge and a prayer: the origins of polyploidy. **Bot. Rev.**, Nova Iorque, v. 41, n. 4, p. 361-390, 1975.

HAYES, R.J.; THILL, C. A. Introgression of cold (4C) chipping from 2X (2 endosperm balance number) potato species into 4X (4EBN) cultivated potatoes using sexual polyploidization. **Amer. J. of Potato Res**, Orono, v. 79, p. 421-431, 2002a.

HAYES, R.J.; THILL, C. A. Selection for cold chipping genotypes from three early generations in a potato breeding program. **Euphytica**, Wageningen, v.128, p. 353-362, 2002b.

HELGADÓTTIR, Á.; LARSEN, A.; MARUM, P.; FRITSEN, H.; LINDVALL, E.; MIETTINEN, E. Prebreeding of red clover (*Trifolium pratense* L.) for northern areas. **Acta Agric. Scand. Sect B., Soil and Plant Sci.**, Copenhagen, v. 50, p. 187-190, 2000.

HERMSEN, J.G. Mechanisms and genetic implications of 2n-gamete formation. **Iowa State J. Res**, Ames, v. 58, n. 4, p. 421-434, 1984a.

HERMSEN, J.G. Nature, evolution, and breeding of polyploids. **Iowa State J. Res**, Ames, v. 58, n. 4, p. 411-420, 1984b.

HERTZSCH, W. The importance of induced polyploidy in forage crop breeding. **Herbage Plant Breeding** [s.l.], p. 54-56, 1960.

HILU, K.W. Polyploidy and the evolution of domesticated plants. **Am. J. Botany**, Columbus, v. 80, n. 12, p. 1492-1499, 1993.

HUSSAIN, S. W.; WILLIAMS, W. M. Evidence of functional gametes with unreduced chromosome number. **Euphytica**, Wageningen, v.97, p. 21-24, 1997.

JONGEDIJK, E.; RAMANNA, M.S.; SAWOR, Z.; HERMSEN, J.G.Th. Formation of first division restitution (FDR) 2n-megaspores through pseudohomotypic division in *ds-1* (desynapsis) mutants of diploid potato: routine production of tetraploid progeny from 2xFDR x 2xFDR crosses. **Theor. Appl. Genet.**, Berlin, v. 82, p. 645-656, 1991.

LEVAN, A. Plant breeding by induction of polyploidy and some results in clover. **Hereditas**, Lund, v. 28, p. 245-246, 1939.

LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. Polyploidy in angiosperms. **Trends Plant Sci.**, Oxford, v. 2, n. 12, p. 470-476, 1997.

LUMARET, R., BRETAGNOLLE, F., MACEIRA, N.O. 2n gamete frequency and bilateral polyploidization in *Dactylis glomerata* L. In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.). **Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives**. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p.15-21.

MADIL, J.; SKEPASTS, A. Red clover in Ontario. **Single and Double Cut Types**. Disponível em: <http://www.google.com.br>. Acesso em: 12 set. 2003.

MALM, N.R.; HITTLE, C.N. selection methods for improving persistence of red clover. **Crop Sci.**, Madison, v.3, p. 285-288, 1963.

MARIANI, A.; TAVOLETTI, S.; VERONESI, F. Alfalfa evolution and breeding through 2n gametes. In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.). **Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives**. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p.73-81.

McCOY, T. J. The inheritance of 2n pollen formation in diploid alfalfa *Medicago sativa*. **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 24, p. 315-323, 1982.

McCOY, T.J. Genome manipulation and molecular genetic analysis of alfalfa (*Medicago sativa* L.). In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.). **Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives**. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p.55-59.

McCOY, T. J.; SMITH, L. Y. Genetics, cytology, and crossing behavior of an alfalfa (*Medicago sativa*) mutant resulting in failure of the postmeiotic cytokinesis. **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 25, p. 390-397, 1983.

McCOY, T. J.; ROWE, D. E. Single cross alfalfa (*Medicago sativa* L.) hybrids produced via 2n gametes and somatic chromosome doubling: experimental and theoretical comparisons. **Theor. Appl. Genet.**, Berlim, v. 72, p. 80-83, 1986.

MEGLIC, V.; SMITH, R.R. Self-Incompatibility and seed set in colchicine, nitrous oxide, and sexually derived tetraploid red clover. **Crop Sci.**, Madison, v. 32, p. 1133-1137, 1992.

MENDIBURU, A. O.; PELOQUIN, S.J. Bilateral sexual polyploidization in potatoes. **Euphytica**, Wageningen, v. 26, p. 573-583, 1977a.

MENDIBURU, A. O.; PELOQUIN, S.J. The significance of 2N gametes in potato breeding. **Theor. Appl. Genet.**, Berlim, v. 49, p. 53-61, 1977b.

MOKHTARZADEH, A.; LEFFEL, R.C.; BEYER, E.H. Maternal line selection for persistence in red clover, *Trifolium pratense* L. **Crop Sci.**, Madison, v. 7, p. 264-266, 1967.

MONTARDO, D. P. **Avaliação e melhoramento genético de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) em duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul**. 2002. 167f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

MOUSSET-DÉCLAS, C.; COLAS, F.; TRONTIN, J.F. Variation in $2n$ production in red clover (*Trifolium pratense* L.): effect of temperature and genotype. In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.). **Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives**. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p.61-65.

MOUSSET-DÉCLAS, C.; FAURIE, F.; TISSERAND, J.L. Is there variability for quality in red clover? In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 17,1993, Palmerston North. **Proceedings...** [S.l.]: New Zealand Grassland Association: Keeling & Mundi, 1993. p.442-443.

NEGRI, V. Frequency of big pollen occurrence in natural population of *Lotus tenuis* Wald et Kit. In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.). **Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives**. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p.51-53.

NETTANCOURT, D. DE. Incompatibility in angiosperms. **Sex. Plant. Reprod.**, Nova Iorque, n. 10, p. 185-199, 1997. Cap. 2: The Genetics of Self-Incompatibility.

NETTANCOURT, D. DE. **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants**. 2. ed. Berlim: Springer, 2001. 322 p.

OTTO, S.P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annu. Rev. Genet**, Palo Alto, n.34, p. 401-437, 2000.

ORTIZ, R. Occurrence and inheritance of $2n$ pollen in *Musa*. **Ann. Bot.**, Bristol, v. 79, p. 449-453, 1997.

PAIM, N.R. Melhoramento Genético de Leguminosas Forrageiras. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C. de; FARIA, V.P. (Coord.). **Pastagens: Fundamentos da Exploração Racional**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1994, p. 893-908. (Série Atualização em Zootecnia, 10).

PARROTT, W.A.; SMITH, R.R. Production of $2n$ pollen in red clover. **Crop Sci.**, Madison, v. 24, p. 469-472, 1984.

PARROTT, W.A.; SMITH, R.R. Description and inheritance of new genes in red clover. **J. Hered.**, Washigton, v. 77, p. 355-358, 1986a.

PARROTT, W.A.; SMITH, R.R. Evidence for the existence of endosperm balance number in the true clovers (*Trifolium* spp.). **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 28, n. 4, p. 581-586, 1986b.

PARROTT, W.A.; SMITH, R.R. Recurrent selection for diploid pollen formation in red clover. **Crop Sci.**, Madison, v. 26, n.6, p. 1132-1135, 1986c.

PARROTT, W.A.; SMITH, R.R.; SMITH, M.M.. Bilateral sexual tetraploidization in red clover. **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 27, p. 64-68, 1985.

PELOQUIN, S.J., CHUJOY, J.E. WERNER, J.E. 4x hybrid progeny from 2x – 2x crosses in potato. In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.). **Gametes with somatic chromossome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species**: achievements and perspectives. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p.23-29.

PELOQUIN, S.J.; YERK, G.L.; WERNER, J.E.; DARMO, E. Potato breeding with haploids and 2n gametes. **Genome**, Ottawa, v. 31, p. 1000-1004, 1989.

PFEIFFER, T.W.; BINGHAM, E.T. Abnormal meiosis in alfalfa, *Medicago sativa*: cytology of 2N egg and 4N pollen formation. **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v. 25, p. 107-112, 1983.

RAMANNA, M.S. The use of 2n gametes in breeding polysomic polyploid species; some achievements and perspectives. In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.). **Gametes with somatic chromossome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species**: achievements and perspectives. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p.91-99.

RAMANNA, M.S.; JACOBSEN, E. Development of 2n gamete producing diploid clones for breeding amylose-free potato. In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.). **Gametes with somatic chromossome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species**: achievements and perspectives. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p.39-44.

RAMANNA, M.S.; JACOBSEN, E. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement: A review. **Euphytica**, Wageningen, v. 133, n. 1, p. 3-8, 2003.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, Palo Alto, v. 29, p. 467-501, 1998.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Neopolyploidy in flowering plants. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, Palo Alto, p. 589-631, 2002.

ROUSSELLE-BOURGEOIS, F. Screening for 2n pollen in diploid potato (*Solanum tuberosum* L.). In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.). **Gametes with somatic chromossome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species**: achievements and perspectives. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p.45-49.

SCHIFINO, M. T.; MORAES FERNANDES, M. I. B. Cytological comparison of diploid and autotetraploid *Trifolium riograndense* Burkart. **Rev. Bras. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 4, p. 637-643, 1986.

SCHIFINO, M. T.; MORAES FERNANDES, M. I. B. Induction of polyploidy and cytological characterization of autotetraploids of *Trifolium riograndense* Burkart (Leguminosae). **Euphytica**, Wageningen, v. 36, p. 863-872, 1987.

SCHIFINO, M. T.; ZANELLA, C.C.; GUS, R. Chromosome number instability in *Phalaris* L. **Cytologia**, Tóquio, v. 50, p. 89-99, 1985.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, 2001.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; FREITAS, L.H.C. DE; SIMIONI, C.; PAIM, N.R. Unreduced gametes in *Leucaena*. **Leucnet News**, Oxford, n. 4, p. 28-29, 1997.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; SIMIONI, C. More about unreduced gametes in *Leucaena*. **Leucnet News**, Oxford, n. 5, p. 21-22, 1998.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; SIMIONI, C. Unreduced gametes in diploid *Leucaena* species. **Leucnet News**, Oxford, n. 6, p. 9-10, 1999.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; CARDOSO, M.; BOFF, T.; SIMIONI, C. Chromosome numbers and unreduced gametes in species of *Leucaena* Benth. (Leguminosae) - New contributions for the taxonomy, evolutionary studies and breeding of the genus. In: GUTTENBERGER, H.; BORZAN, Z.; SCHLARBAUM, S.E.; HARTMAN, T.P.V. (Eds.). **Cytogenetics studies of forest trees and shrubs** - Review, present status and outlook on the future. Zloven: Arbora Publishers, 2000. p. 181-190.

SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J.; SOLTIS, D.E. Molecular data and polyploid evolution in plants. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. DOYLE, J.J. (Eds.). **Molecular Systematics of Plants**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 46-51.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution, **Tree**, Berkeley, v. 14, n.9, p. 348-352, 1999.

SOUZA, E.H. DE; PAIM, N.R.; SCHIFINO, M.T.; RIBOLDI, J. Caracterização morfológica e fisiológica de formas diplóide e tetraplóide de *Trifolium riograndense* em comparação com *Trifolium repens* e *Trifolium polymorphum*. **Pesqui. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 23, n. 6, p. 599-607, 1988.

STEBBINS, G.L. Types of polyploids: their classification and significance. **Adv. Genet.**, Nova Iorque, v. 1, p. 403-429, 1947.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal Evolution in Higher Plants**. Londres: Addison-Wesley, Reading, 1971. 216p. Cap. 5: The morphological, physiological and cytogenetic significance of polyploidy; Cap. 6: Polyploidy, plant geography and major trends of evolution.

STEBBINS, G.L. Polyploidy in plants: Unsolved problems and prospects. In: LEWIS (Ed.). **Polyploidy: Biological Relevance**. St Louis, Missouri: Washington University, 1980. p. 495-516.

SYBENGA, J. **Cytogenetics and Plant Breeding**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 469 p. Cap. 11: Manipulation of genome composition. B. Gene Dose: duplication, polyploidy and gametic chromosome number.

TAVOLETTI, S. Cytology of 2N egg production in *Medicago sativa* ssp. *falcata*. In: VERONESI, F.; BULLITA, S.; CAREDDA, S. (Eds.). **Ploidy and chromosome manipulation in forage breeding**. Alghero: Eucarpia, 1991. p. 162-164.

TAVOLETTI, S. Cytological mechanisms of 2n egg formation in a diploid genotype of *Medicago sativa* subsp. *falcata*. **Euphytica**, Wageningen, v. 75, p. 1-8, 1994.

TAVOLETTI, S.; MARIANI, A.; VERONESI, F. Cytological analysis of macro- and microsporogenesis of a diploid alfalfa clone producing male and female 2n gametes. **Crop Sci.**, Madison, v. 31, p. 1258-1263, 1991a.

TAVOLETTI, S.; MARIANI, A.; VERONESI, F. Phenotypic recurrent selection for 2n pollen and 2n egg production in diploid alfalfa. **Euphytica**, Wageningen, v. 57, p. 97-102, 1991b.

TAYLOR, N.L. Clovers. In: FEHR, W.R.; HADLEY, H.H. (Eds.). **Hybridization of Crop Plants**. Madison: Advances Society of Agronomy and Crop Science Society of America, 1980. p. 261-273.

TAYLOR, N.L. Stability of S-alleles in a red clover. **Crop Sci.**, Madison, v. 22, p. 1222-1225, 1982.

TAYLOR, N.L. Registration of diploid and derived tetraploid red clover germoplasm. **Crop Sci.**, Madison, v. 23, p. 1226, 1983.

TAYLOR, N.L. Forage Legumes. In: FEHR, W.R. (Ed.). **Principles of cultivar development: Crop Species**. New York : MacMillan, 1987. v.2, p. 209-246.

TAYLOR, N.L. Registration of tetraploid red clover germoplasms from 2x-4x and 4x-2x crosses. **Crop Sci.**, Madison, v. 29, p. 1578-1579, 1989.

TAYLOR, N.L.; ANDERSON, M.K.; QUESENBERRY, K.H.; WATSON, L. Doubling the chromosome number of *Trifolium* species using nitrous oxide. **Crop Sci.**, Madison, v. 16, p. 516-518, 1976.

TAYLOR, N.L.; ANDERSON, M.K. Maintenance of parental lines for hybrid red clover. **Crop Sci.**, Madison, v. 20, p. 367-369, 1980.

TAYLOR, N.L.; BERGER, S. Polyploids from 2x-4x and 4x-2x crosses in red clover. **Crop Sci.**, Madison, v. 29, n.1, p. 233-235, 1989.

TAYLOR, N.L.; CHEN, K. Isolation of trisomics from crosses of diploid, triploid, and tetraploid red clover. **Crop Sci.**, Madison, v. 28, n. 2, p. 209-213, 1988.

TAYLOR, N.L.; CORNELIUS, P.L.; LONG, M.G. Phenotypic recurrent selection for multiple-parted flower heads in red clover. **Crop Sci.**, Madison, v. 25, p. 489-494, 1985.

TAYLOR, N.L.; GIRI, N. Frequency and stability of tetraploids from 2x-4x crosses in red clover. **Crop Sci.**, Madison, v. 23, p. 1191-1194, 1983.

TAYLOR, N.L.; MUNDELL, R.E.; MOUSSET-DÉCLAS, C. Registration of ruffled leaflet tetraploid red clover genetic stock. **Crop Sci.**, Madison, v. 40, p. 870, 2000.

TAYLOR, N.L.; QUESENBERRY, K.H. **Red Clover Science**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1996. 226 p.

TAYLOR, N.L.; SMITH, R.S. Red clover breeding and genetics. **Adv. Agron.**, Nova Iorque, v. 31, n.1, p. 125-153, 1979.

TAYLOR, N.L.; SMITH, R.S. Red Clover. In: BARNES, R.F.; MILER, D.A.; NELSON, C.J. (Eds). **Forages**. Ames: Iowa State University Press, 1995. v.1 p. 217-226.

TAYLOR, N.L.; WISEMAN, E.O. Triploids and tetraploids from 4x-2x crosses in red clover. **Crop Sci.**, Madison, v. 27, p. 14-18, 1987.

TOFTE, J.E.; SMITH, R.R. Cytology of bilaterally derived tetraploid red clover. **Crop Sci.**, Madison, v. 29, p. 37-41, 1989.

VEILLEUX, R. Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding. In: JANICK, J. (Ed.). **Plant Breeding Reviews**. Westport: Avi Publishing, 1985. v.3, p. 253-288.

VERONESI, F.; MARIANI, A.; BINGHAM, E.T. Unreduced gametes in diploid *Medicago* and their importance in alfalfa breeding. **Theor. Appl. Genet.**, Berlin, 72, p. 37-41, 1986.

VESTAD, R. The effect of induced autopolyploidy on resistance to clover rot (*Sclerotinia trifoliorum* Erikss.) in red clover. **Euphytica**, Wageningen, v. 9, p. 35-38, 1960.

VORSA, N.; BINGHAM, E.T. Cytology of 2n pollen formation in diploid alfalfa, *Medicago sativa*. **Can. J. Genet. Cytol**, Ottawa, v. 21, p. 525-530, 1979.

WAGENVOORT, M.; DEN NIJS, A.P.M. Implications of $2n$ pollen for breeding tetraploid perennial ryegrass. In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.). **Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species**: achievements and perspectives. Perugia: Forages Plant Breeding Institute, 1992. p. 5-14.

WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. **Plant Mol. Biol.**, Netherlands, v. 42, p. 225 – 249, 2000.

WERNER, J.E.; PELOQUIN, S.J. Occurrence and mechanisms of $2n$ egg formation in $2x$ potato. **Genome**, Ottawa, v. 34, p. 975-982, 1991.

YAMAGUCHI, H.; SAWAY, A.; UCHIYAMA, K. Improvement of red clover persistence in Japan. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 17, 1993, Palmerston North. **Proceedings...** [S.I.]: New Zealand Grassland Association: Keeling & Mundi, 1993. p. 666-667.

YAN, G.; FERGUSON, A.R.; McNEILAGE, M.A.; MURRAY, B.G. Numerically unreduced ($2n$) gametes and sexual polyploidization in *Actinidia*. **Euphytica**, Wageningen, v.96, p. 267-272, 1997.

ZLESK, D.C.; THILL, C.A. Variation for $2n$ pollen production and male fertility in wild *Solanum* germplasm resistant to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (US-8). **Amer. J. of Potato Res.**, Orono, v. 79, p. 219-229, 2002.

ZOHARY, M.; HELLER, D. **The genus Trifolium**. Jerusalem: The Israel Academy of Sciences and Humanities, 1984. 606 p. Caps: General part; Taxonomic part; Section six: *Trifolium*.

7. APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Produção de grãos de pólen gigantes, por flor, nas 226 plantas analisadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Plantas avaliadas	Nº de grãos gigantes			% total de grãos gigantes	Selecionada (S) Eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3		
1	0	0	0	0	E
3	0	0	15	2,0	S
5	0	0	0	0	E
6	2	1	3	0,4	E
7	0	1	0	0,07	E
8	1	10	10	1,4	S
9	2	0	0	0	E
10	0	5	0	0,33	E
11	0	0	0	0	E
12	0	2	0	0,13	E
13	2	0	0	0,13	E
15	1	7	3	0,73	E
17	5	0	1	0,4	E
18	7	2	13	1,47	S
19	0	0	0	0	E
20	8	128	0	9,07	S
21	1	0	0	0,07	E
23	0	2	2	0,27	E
32	0	6	0	0,4	E
34	4	5	7	1,07	S
36	1	9	17	1,8	S
39	0	0	5	0,33	E
44	1	2	5	0,53	E
45	1	0	6	0,47	E
47	1	5	1	0,47	E
48	13	6	0	1,27	S
56	0	0	0	0	E
62	1	0	0	0,07	E
65	0	0	0	0	E
73	0	0	0	0	E
74	0	7	2	0,6	E
76	0	0	1	0,07	E
77	0	5	0	0,33	E
79	0	0	4	0,27	E
82	0	0	0	0	E
83	22	0	4	1,73	S
85	6	3	0	0,6	E
87	7	1	26	2,27	S
88	1	4	0	0,33	E
91	0	1	0	0,07	E
100	0	38	11	3,27	S

...continuação

APÊNDICE 1 – Produção de grãos de pólen gigantes, por flor, nas 226 plantas analisadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Plantas avaliadas	Nº de grãos gigantes			% total de grãos gigantes	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3		
102	1	0	22	1,53	S
103	2	2	1	0,33	E
109	0	56	2	3,87	S
110	2	0	0	0,13	E
112	0	0	0	0	E
113	0	0	1	0,07	E
117	4	3	4	0,73	E
118	0	42	13	3,67	S
119	0	0	8	0,53	E
121	0	0	0	0	E
123	0	0	1	0,07	E
125	1	2	2	0,33	E
126	0	0	0	0	E
129	0	7	0	0,47	E
130	1	1	5	0,47	E
132	0	0	12	0,8	E
135	3	0	0	0,2	E
136	69	0	0	4,6	S
139	0	2	5	0,47	E
146	0	0	0	0	E
147	0	0	0	0	E
148	0	0	2	0,13	E
149	4	2	21	1,8	S
150	1	8	2	0,73	E
151	2	0	18	1,33	S
152	2	4	7	0,87	E
158	0	0	2	0,13	E
160	0	0	12	0,8	E
161	10	0	33	2,87	S
162	6	1	2	0,6	E
169	0	0	0	0	E
171	0	0	20	1,33	S
173	1	0	2	0,2	E
174	0	5	0	0,33	E
177	3	0	1	0,27	E
179	0	1	6	0,47	E
182	5	1	7	0,87	E
183	0	0	0	0	E
184	0	4	20	1,6	S
187	0	2	0	0,13	E

...continuação

APÊNDICE 1 – Produção de grãos de pólen gigantes, por flor, nas 226 plantas analisadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Plantas avaliadas	Nº de grãos gigantes			% total de grãos gigantes	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3		
192	1	0	0	0,07	E
193	0	4	0	0,27	E
196	8	0	2	0,67	E
197	2	0	0	0,13	E
201	0	0	0	0	E
202	21	0	1	1,47	S
206	0	0	0	0	E
208	0	0	0	0	E
209	0	1	0	0,07	E
211	13	3	14	2,0	S
212	1	0	0	0,07	E
214	0	2	3	0,33	E
218	0	1	4	0,33	E
221	0	0	1	0,07	E
228	0	0	0	0	E
230	0	0	2	0,13	E
234	1	0	20	1,4	S
236	0	0	0	0	E
237	0	5	0	0,33	E
238	10	9	8	1,8	S
239	0	0	0	0	E
241	0	1	2	0,2	E
242	1	0	0	0,07	E
243	0	0	0	0	E
245	0	2	0	0,13	E
250	0	0	0	0	E
251	1	0	1	0,13	E
253	3	1	4	0,53	E
255	5	0	0	0,33	E
257	0	7	12	1,27	S
260	0	7	5	0,8	E
262	0	0	20	1,33	S
263	0	8	0	0,53	E
270	2	0	0	0,13	E
272	0	0	1	0,07	E
273	2	4	2	0,53	E
275	0	2	0	0,13	E
277	0	0	0	0	E
278	0	6	0	0,4	E
279	0	5	0	0,33	E
280	3	0	0	0,2	E
281	0	1	4	0,33	E

...continuação

APÊNDICE 1 – Produção de grãos de pólen gigantes, por flor, nas 226 plantas analisadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Plantas avaliadas	Nº de grãos gigantes			% total de grãos gigantes	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3		
283	0	1	0	0,07	E
284	2	0	0	0,13	E
285	0	0	0	0	E
287	0	9	10	1,27	S
289	3	9	0	0,8	E
290	0	2	0	0,13	E
292	0	0	21	1,4	S
293	0	0	21	1,4	S
294	0	0	0	0	E
298	0	15	0	1	S
299	2	50	3	3,67	S
300	0	3	7	0,67	E
302	0	0	0	0	E
304	0	0	2	0,13	E
305	0	1	0	0,07	E
307	0	20	10	2,0	S
309	0	0	0	0	E
310	4	4	1	0,6	E
312	5	3	4	0,8	E
313	11	1	11	1,53	S
318	0	2	8	0,67	E
323	0	32	0	2,13	S
324	0	0	0	0	E
330	0	0	0	0	E
331	5	2	6	0,87	E
335	0	4	0	0,27	E
336	0	0	1	0,07	E
341	0	1	1	0,13	E
342	2	4	0	0,4	E
344	0	0	0	0	E
345	0	0	0	0	E
348	0	0	0	0	E
350	0	0	0	0	E
354	0	0	3	0,2	E
355	20	0	0	1,33	S
356	0	0	4	0,27	E
357	0	0	0	0	E
359	0	3	0	0,2	E
360	0	0	0	0	E
361	0	2	18	1,33	S
363	0	0	0	0	E

...continuação

APÊNDICE 1 – Produção de grãos de pólen gigantes, por flor, nas 226 plantas analisadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Plantas avaliadas	Nº de grãos gigantes			% total de grãos gigantes	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3		
365	8	5	3	1,07	S
369	22	0	0	1,47	S
370	0	0	3	0,2	E
371	0	0	0	0	E
372	0	0	0	0	E
373	0	0	0	0	E
376	0	1	0	0,07	E
377	2	24	11	2,47	S
379	1	1	5	0,47	E
388	0	0	5	0,33	E
393	0	20	0	1,33	S
394	0	0	0	0	E
398	0	0	0	0	E
399	0	0	7	0,47	E
402	1	0	0	0,07	E
410	0	0	0	0	E
411	0	7	2	0,6	E
415	0	1	0	0,07	E
418	0	3	3	0,4	E
421	0	4	0	0,27	E
426	0	0	0	0	E
427	0	0	1	0,07	E
430	18	2	0	1,33	S
433	0	5	0	0,33	E
434	0	1	0	0,07	E
439	0	0	1	0,07	E
441	0	0	0	0	E
442	0	0	0	0	E
453	0	0	0	0	E
457	0	5	5	0,67	E
459	1	0	0	0,07	E
460	0	0	3	0,2	E
462	0	7	1	0,53	E
464	0	0	1	0,07	E
465	20	0	29	3,27	S
466	0	7	0	0,47	E
469	0	0	0	0	E
471	1	0	2	0,2	E
473	0	1	7	0,53	E
476	1	1	4	0,47	E
477	0	10	0	0,67	E
478	1	0	30	2,07	S

...continuação

APÊNDICE 1 – Produção de grãos de pólen gigantes, por flor, nas 226 plantas analisadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Plantas Avaliadas	Nº de grãos gigantes			% total de grãos Gigantes	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3		
480	20	15	0	2,33	S
481	0	0	0	0	E
482	0	0	0	0	E
483	0	0	0	0	E
485	0	0	0	0	E
486	0	2	0	0,13	E
487	1	2	1	0,27	E
500	0	9	3	0,8	E
508	0	0	0	0	E
510	0	0	0	0	E
512	0	0	0	0	E
513	0	0	1	0,07	E
517	3	4	0	0,47	E
518	5	3	2	0,67	E
520	3	3	6	0,8	E
519	1	0	0	0,07	E
527	0	0	0	0	E
529	0	3	0	0,2	E
531	0	0	27	1,8	S

APÊNDICE 2 - Tamanho médio de grãos de pólen normais e gigantes e limites de comprimento e largura dos grãos ocorrentes nas plantas selecionadas da cultivar Quiñiqueli no primeiro ciclo (Exp. 1).

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*
3	52,30-50,74	47,3-55,9/47,3-55,9	63,14-62,65	60,2-64,5/58,05-64,5
8	52,60-49,88	49,45-55,9/47,3-53,75	65,29-62,88	62,35-70,95/60,2-68,8
18	53,16-49,02	49,45-55,9/47,3-51,6	65,72-62,14	60,2-75,25/55,9-70,95
20	52,03-48,30	49,45-55,9/45,15-49,45	66,28-61,64	62,35-77,4/58,05-68,8
34	52,95-48,26	47,3-55,9/45,15-49,45	66,11-62,07	60,2-73,1/55,9-73,1
36	55,18-52,17	53,75-58,05/49,45-53,75	68,39-63,66	62,35-73,1/60,2-68,8
48	53,75-52,76	45,15-58,05/45,15-58,05	63,18-62,57	60,2-64,5/60,2-64,5
83	52,17-46,58	47,3-55,9/43,0-49,45	65,33-59,83	62,35-68,8/55,9-64,5
87	52,03-50,09	49,45-55,9-47,3-51,6	66,07-62,75	64,5-68,8/60,2-66,65
100	51,60-49,17	47,3-58,05/43,0-51,6	65,76-62,09	60,2-73,10/58,05-68,8
102	52,74-51,88	47,3-55,9/47,3-53,75	66,65-64,50	64,5-70,95/60,2-68,8
109	48,87-45,58	43,0-53,75/38,7-51,6	65,53-59,49	60,2-73,1/55,9-64,5
118	53,58-51,06	47,3-55,9/47,3-53,75	64,50-62,35	64,5-64,5/55,9-64,5
136	55,08-49,17	53,75-55,9/47,3-53,75	68,24-61,79	64,5-73,1/60,2-64,5
149	53,97-52,46	49,45-55,9/47,3-55,9	64,73-59,14	58,05-73,1/55,9-64,5
151	55,38-53,41	53,75-58,05/49,45-53,75	67,94-64,17	62,35-73,1/55,9-70,95
161	54,76-52,98	51,6-55,9/49,45-53,75	66,28-63,86	62,35-75,25/60,2-70,95
171	52,31-50,46	49,45-55,9/47,3-53,75	64,97-63,86	62,35-68,8/58,05-66,65
184	53,97-51,17	51,6-55,9/49,45-53,75	65,79-62,14	64,5-68,8/62,35-66,65
202	50,74-47,02	47,3-53,75/43,0-53,75	63,43-60,20	60,2-64,5/60,2-60,2
211	51,82-50,31	49,45-53,75/47,3-53,75	63,36-61,21	58,05-66,65/58,05-66,65
234	52,31-49,02	49,45-55,9/47,3-51,6	66,95-62,95	60,2-70,95/60,2-64,5
238	55,77-50,76	51,6-55,9/47,3-53,75	64,39-59,51	62,35-68,8/55,9-64,5

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

...continuação

APÊNDICE 2 - Tamanho médio de grãos de pólen normais e gigantes e limites de comprimento e largura dos grãos ocorrentes nas plantas selecionadas da cultivar Quiñiqueli no primeiro ciclo (Exp. 1).

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*
257	52,82-51,13	49,45-58,05/47,3-55,9	64,22-62,07	60,2-73,1/55,9-70,95
262	54,83-52,82	51,6-58,05/49,45-55,9	66,22-64,50	60,2-68,8/60,2-66,65
287	55,10-51,60	53,75-55,9/49,45-53,75	64,93-62,78	62,35-68,8/60,2-66,65
292	54,76-49,17	43,0-55,9/34,4-51,6	61,28-55,64	55,9-64,5/55,9-60,2
293	52,78-51,60	49,45-55,9/49,45-53,75	66,65-65,45	64,5-73,1/62,35-70,95
298	51,27-49,12	45,15-55,9/45,15-51,6	64,76-62,88	62,35-68,8/60,2-66,65
299	50,96-46,87	47,3-53,75/45,15-49,45	66,41-59,53	60,2-73,1/55,9-64,5
307	54,46-53,11	51,6-58,05/47,3-55,9	66,28-65,40	62,35-70,95/60,2-68,8
313	52,89-50,74	49,45-53,75/47,3-53,75	61,28-59,38	58,05-64,5/55,9-64,5
323	50,16-47,58	47,3-53,75/45,15-51,6	66,65-64,03	64,5-68,8/62,35-68,8
355	53,47-49,73	49,45-55,9/45,15-51,6	65,94-63,79	64,5-70,95/62,35-66,65
361	52,46-49,45	49,45-53,75/47,3-53,75	68,16-62,14	64,5-73,1/58,05-66,65
365	57,12-48,22	53,75-58,05/47,3-49,45	66,11-65,29	60,2-75,25/55,9-75,25
369	49,88-47,88	45,15-53,75/43,0-51,6	65,29-63,14	64,5-68,8/60,2-66,65
377	54,05-49,42	47,3-58,05/45,15-53,75	64,22-59,62	60,2-70,95/55,9-64,5
393	53,75-51,32	49,45-58,05/47,3-58,05	64,50-60,67	64,5-64,5/60,2-64,5
430	52,74-50,59	49,45-55,9/45,15-53,75	65,27-61,36	60,2-70,95/60,2-66,65
465	52,61-51,17	49,45-53,75/49,45-53,75	61,92-61,81	60,2-64,5/55,9-64,5
478	53,38-51,23	51,6-55,9/49,45-53,75	70,74-65,53	64,5-75,25/58,05-73,1
479	54,61-50,31	53,75-58,05/49,45-51,6	68,80-62,63	64,5-75,25/55,9-73,1
480	55,90-53,94	51,6-60,2/49,45-58,05	66,71-64,50	64,5-73,1/58,05-70,95
531	55,69-51,39	53,75-58,05/49,45-53,75	66,88-61,40	64,5-70,95/58,05-64,5
Médias	53,21-50,24		65,63-64,46	

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

APÊNDICE 3 – Freqüências de diferentes números cromossômicos somáticos registrados nas plantas poliplóides do primeiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Plantas	Número cromossômico				Nº total de células
	28	Menos de 21	Entre 21 e 28	Mais de 28	
T1-1	12	0	3	2	17
T1-2	9	0	0	1	10
T1-3	11	1	2	1	15
T1-4	12	0	0	0	12
T1-6	7	0	0	1	8
T1-7	12	0	2	1	15
T1-8	14	1	0	1	16
T1-9	10	0	3	1	14
T1-10	9	0	2	0	11
T1-13	11	0	0	0	11
T1-14	17	0	2	3	22
T1-16	10	0	0	0	10
T1-18	14	0	0	1	15
T1-20	10	1	0	0	11
T1-21	12	1	5	0	18
T1-22	10	1	1	1	13
T2-1	16	0	2	4	22
T2-2			NR		
T2-3	10	0	0	0	10
T2-4	10	0	2	0	12
T2-5	11	0	0	0	11
T2-6	16	0	2	3	21
T2-7	10	0	0	1	11
T2-8	13	0	0	0	13

NR=não registrado.

...continuação

APÊNDICE 3 – Frequências de diferentes números cromossômicos somáticos registrados nas plantas poliplóides do primeiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Plantas	Número cromossômico		Nº total de 28	Plantas	
	28	Menos de 21		Menos de 21	
T2-9	13	0	0	1	14
T2-11	14	0	1	7	22
T2-12	13	0	0	1	14
T2-13	15	0	1	8	24
T2-14	24	3	46	1	74
T2-16	13	1	1	1	16
T2-17	12	2	0	0	14
T2-18	10	0	0	1	11
T2-19	16	0	0	6	16
T1-1	12	0	3	2	17
T1-2	9	0	0	1	10

NR= não registrado

APÊNDICE 4 – Cruzamentos 4X – 2X realizados no primeiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Planta –mãe (4X)	Genitores masculinos (2X selecionados)	Nº flores polinizadas	Sementes coletadas	% flores polinizadas que produziram sementes
T1-1	298-149	20	2	10
T1-2	478	26	1	3,85
T1-2	298	16	4	0,25
T1-2	287	20	0	0
T1-2	36	17	0	0
T1-2	18-313	22	0	0
T1-4	480-478-293	30	12	0,4
T1-6	323	21	0	0
T1-7	313-430-298	24	0	0
T1-7	18	20	4	0,2
T1-7	293-8-102-298-262-478	30	0	0
T1-7	323-313-18-238	32	0	0
T1-9	109-313-20	18	0	0
T1-10	365-478	23	0	0
T1-10	211	16	2	12,5
T1-10	102-323-238	30	0	0
T1-14	313	18	3	16,67
T1-14	313-109-87	30	0	0
T1-14	3-34-298	24	0	0
T1-18	211-323-87-8-102-480	32	2	6,25
T1-18	238-298-313	24	4	16,67
T1-18	323	21	0	0
T1-21	465	17	0	0
T1-21	355-8-313-3	24	5	20,83
T1-21	361	21	0	0
T2-2	257	16	0	0
T2-4	34-3	20	0	0
T2-5	478-292	21	3	14,28
T2-5	149-355	18	0	0
T2-5	83-171	20	0	0
T2-5	202-238	21	0	0
T2-7	3-293-287	22	0	0
T2-8	257	15	2	13,33
T2-8	377-480	19	0	0
T2-9	298	18	0	0
T2- 11	149	20	4	20
T2-12	430-298-102	23	2	8,69
T2-13	377-430-313	20	1	5
T2-14	298	15	0	0
T2-14	257-478	26	0	0
T2-17	18	30	8	26,67
Total		900	59	6,56

APÊNDICE 5 – Análise de viabilidade de grãos de pólen em cada flor amostrada nas plantas do segundo ciclo de seleção (Exp. 1).

Planta	Flor	Nº grãos normais	Nº grãos grandes	Nº grãos inviáveis
T1-2 I1	1	212	210	78
	2	244	172	84
	3	187	222	91
Total		643 (42,87%)	604 (40,27%)	253 (16,86%)
T1-4 I1	1	201	66	233
	2	132	81	287
	3	241	74	185
Total		574 (38,27%)	221 (14,73%)	705 (47,0%)
T1-4 I3	1	157	144	199
	2	185	192	123
	3	236	155	109
Total		578 (38,53%)	491 (32,73%)	431 (28,74%)
T1-4 I4	1	204	186	110
	2	215	110	175
	3	183	223	94
Total		602 (40,13%)	519 (34,6%)	379 (25,27%)
T1-4 I6	1	174	108	218
	2	303	68	129
	3	336	44	120
Total		813 (54,2%)	220 (14,67%)	467 (31,13%)
T1-21 I2	1	207	166	127
	2	207	215	78
	3	214	196	90
Total		628 (41,87%)	577 (38,47%)	295 (19,66%)
T2-5 I1	1	266	28	206
	2	145	11	344
	3	232	27	241
Total		643 (42,87%)	66 (4,4%)	791 (52,73%)
T2-5 I2	1	347	45	108
	2	290	112	98
	3	333	46	121
Total		970 (64,67%)	203 (13,53%)	327 (21,8%)

I=irmão

... continuação

APÊNDICE 5 – Análise de viabilidade de grãos de pólen em cada flor amostrada nas plantas do segundo ciclo de seleção (Exp. 1).

Planta	Flor	Nº grãos normais	Nº grãos gigantes	Nº grãos inviáveis
T2-5 I3	1	279	56	165
	2	259	25	216
	3	278	67	155
Total		816 (54,4%)	148 (9,88%)	536 (35,72%)
T2-11 I1	1	106	90	304
	2	82	84	334
	3	138	116	246
Total		326 (21,73%)	290 (19,33%)	884 (58,94%)
T2-12 I1	1	188	120	192
	2	288	35	177
	3	289	73	138
Total		765 (51%)	228 (15,2%)	507 (33,8%)

I=irmão

APÊNDICE 6 – Frequências de diferentes números cromossômicos somáticos registrados nas plantas do segundo ciclo de seleção (Exp. 1).

Plantas	Número cromossômico					Nº total células analisadas	Nº cromossômico determinado
	21	28	menos de 21	entre 21 e 28	mais de 28		
Número de células							
T1-2 I1	1	4	0	1	0	6	28 (?)
T1-4 I1	19	0	2	8	0	29	21
T1-4 I2	0	11	1	4	0	16	28
T1-4 I3	10	1	0	3	0	14	21
T1-4 I4	0	13	1	1	4	19	28
T1-4 I5	11	0	0	5	0	16	21
T1-4 I6			NR				?
T1-14 I1	3	16	0	3	2	24	28
T1-21 I1	10	0	2	2	0	14	21
T1-21 I2	10	1	0	2	0	13	21
T2-5 I1	19	0	2	1	0	22	21
T2-5 I2			NR				?
T2-5 I3							?
T2- 11 I1	10	1	0	6	0	17	21
T2- 11 I2	7	0	0	1	0	8	21 (?)
T2- 11 I3			NR				?
T2-12 I1	17	0	1	1	1	20	21

I= irmão;

NR= não registrado;

? = número cromossômico não determinado.

APÊNDICE 7- Análise estatística das variáveis porcentagem de grãos de pólen normais, gigantes e inviáveis nas plantas do segundo ciclo de seleção do Experimento 1.

```

=====
Programa GENES                               INT. AO ACASO
Arquivo de dados :                           A:\tab6(exp1).dat
Número de variáveis :                         3
Número de genótipos :                        6
=====

```

ANALISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => % grãos normais

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	5	851,608798	170,32176	2,0584	,223517
RESÍDUO	5	413,7261	82,74522		
TOTAL	10	1265,3349			
MÉDIA geral		44,5945454545455			
CV(%)		20,3980999699759			

PARÂMETROS GENÉTICOS - Obtidos para genótipos

VARIÂNCIA FENOTÍPICA (média)	101,822794
VARIÂNCIA AMBIENTAL (média)	49,467252
VARIÂNCIA GENOTÍPICA (média)	52,355541
HERDABILIDADE (US : média da família) - %	51,4183
CORRELAÇÃO INTRACLASSE (US : parcela) - %	38,753
COEF. VARIAÇÃO GENÉTICO (%)	16,2256
RAZÃO CVg/CVe - Média dos genótipos	,7954
NÚMERO MÉDIO DE REPETIÇÕES	1,6727

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => % grãos gigantes

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	5	1162,038616	232,407723	2,8788	,135331
RESÍDUO	5	403,6581	80,73162		
TOTAL	10	1565,6967			
MÉDIA geral		21,6190909090909			
CV(%)		41,5608485427511			

PARÂMETROS GENÉTICOS - Obtidos para genótipos

VARIÂNCIA FENOTÍPICA (média)	138,939404
VARIÂNCIA AMBIENTAL (média)	48,26347
VARIÂNCIA GENOTÍPICA (média)	90,675934
HERDABILIDADE (US : média da família) - %	65,2629
CORRELAÇÃO INTRACLASSE (US : parcela) - %	52,9008
COEF. VARIAÇÃO GENÉTICO (%)	44,0462
RAZÃO CVg/CVe - Média dos genótipos	1,0598
NÚMERO MÉDIO DE REPETIÇÕES	1,6727

...continuação.

APÊNDICE 7- Análise estatística das variáveis porcentagem de grãos de pólen normais, gigantes e inviáveis nas plantas do segundo ciclo de seleção do Experimento 1.

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => % grãos inviáveis

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	5	1147,369155	229,473831	1,515	,329786
RESÍDUO	5	757,3163	151,46326		
TOTAL	10	1904,6855			
MÉDIA geral			33,7863636363636		
CV(%)			36,4260599529896		

PARÂMETROS GENÉTICOS - Obtidos para genótipos

VARIÂNCIA FENOTÍPICA (média)	137,185446
VARIÂNCIA AMBIENTAL (média)	90,548691
VARIÂNCIA GENOTÍPICA (média)	46,636756
HERDABILIDADE (US : média da família) - %	33,9954
CORRELAÇÃO INTRACLASSE (US : parcela) - %	23,542
COEF. VARIAÇÃO GENÉTICO (%)	20,2126
RAZÃO CV _g /CV _e - Média dos genótipos	,5549
NÚMERO MÉDIO DE REPETIÇÕES	1,6727

MÉDIAS DAS VARIÁVEIS

TRAT	REPET	%NORM	%GIG	%INV
1 (T1-2)	1	42,8700	40,2700	16,8600
2 (T1-4)	4	42,7825	24,1825	33,0350
3 (T1-21)	1	41,8700	38,4700	19,6600
4 (T2-5)	3	53,9800	9,2700	36,7500
5 (T2-11)	1	21,7300	19,3300	58,9400
6 (T2-12)	1	51,0000	15,2000	33,8000

TRAT= tratamento

REPET= repetição

%NORM= porcentagem de grãos normais

%GIG= porcentagem de grãos gigantes

%INV= porcentagem de grãos inviáveis

APÊNDICE 8 – Análise de viabilidade de grãos de pólen em cada flor amostrada nas plantas do terceiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Planta	Flor	Nº grãos normais	Nº grãos gigantes	Nº grãos inviáveis
a	1	313	40	147
	2	351	45	104
	3	311	11	178
Total		975 (65%)	96 (6,4%)	429 (28,6%)
b	não floresceu			
c	1	259	94	147
	2	309	76	115
	3	171	149	180
Total		739 (49,27%)	319 (21,26%)	442 (29,47%)
d	não floresceu			
e	1	237	104	159
	2	280	63	157
	3	331	44	125
Total		848 (56,53%)	211 (14,07%)	441 (29,4%)

APÊNDICE 9 – Frequências de diferentes números cromossômicos somáticos registrados nas plantas do terceiro ciclo de seleção (Exp. 1).

Genótipo	Número cromossômico					Nº total células analisadas	Nº cromossômico determinado
	21	28	menos de 21	entre 21 e 28	mais de 28		
	Número de células						
a	18	5	0	7	1	31	21
b	1	15	0	1	4	21	28
c	6	8	4	5	0	23	provável 28 (?)
d					não registrado		
e	3	3	5	9	0	20	?

? = número cromossômico não determinado.

APÊNDICE 10 – Análise de viabilidade de grãos de pólen em cada flor amostrada nas plantas do quarto ciclo de seleção (Exp. 1).

Planta	Flor	Nº grãos normais	Nº grãos gigantes	Nº grãos inviáveis
a1	1	206	104	190
	2	193	146	161
	3	328	64	108
Total		727 (48,47%)	314 (20,93%)	459 (30,6%)
a2	1	282	75	143
	2	309	36	155
	3	386	20	94
Total		977 (65,14%)	131 (8,73%)	392 (26,13%)
a3	não floresceu			
a4	1	220	82	198
	2	227	52	221
	3	278	49	173
Total		725 (48,33%)	183 (12,2%)	592 (39,47%)
a5	1	249	39	212
	2	214	13	273
	3	197	12	291
Total		660 (44,0%)	64 (4,27%)	776 (51,73%)
a6	1	101	30	369
	2	60	68	372
	3	37	40	423
Total		198 (13,2%)	138 (9,2%)	1164 (77,6%)
a7	1	283	58	159
	2	280	22	198
	3	334	22	144
Total		897 (59,8%)	102 (6,8%)	501 (33,4%)
a8	não floresceu			
e1	1	123	28	349
	2	69	38	393
	3	114	8	378
Total		306 (20,4%)	74 (4,93%)	1120 (74,67%)
e2	1	289	69	142
	2	263	34	203
	3	279	18	203
Total		831 (55,4%)	121 (8,07%)	548 (36,53%)
e3	não floresceu			
e4	não floresceu			
e5	1	206	18	276
	2	165	14	321
	3	160	29	311
Total		531 (35,4%)	61 (4,07%)	908 (60,53%)

APÊNDICE 11 - Análise estatística das variáveis porcentagem de grãos de pólen normais, gigantes e inviáveis nas plantas do quarto ciclo de seleção do Experimento 1.

Programa GENES	INT. AO ACASO
Arquivo de dados :	A:\tab10(exp1).dat
Número de variáveis :	3
Número de genótipos :	2

ANALISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => % pólen normal

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	1	1,502222	1,502222	,0041	100,0
RESÍDUO	7	2573,7677	367,6811		
TOTAL	8	2575,2699			
MÉDIA geral		46,2011111111111			
CV(%)		41,5033576569194			

PARÂMETROS GENÉTICOS - Obtidos para genótipos

VARIÂNCIA FENOTÍPICA (média)	,375556
VARIÂNCIA AMBIENTAL (média)	91,920275
VARIÂNCIA GENOTÍPICA (média)	,0
HERDABILIDADE (US : média da família) - %	,
CORRELAÇÃO INTRACLASSE (US : parcela) - %	,
COEF. VARIAÇÃO GENÉTICO (%)	,
RAZÃO CVg/CVe - Média dos genótipos	,
NÚMERO MÉDIO DE REPETIÇÕES	4,

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => % pólen gigante

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	1	43,52445	43,52445	1,7141	,231724
RESÍDUO	7	177,741	25,391571		
TOTAL	8	221,2654			
MÉDIA geral		8,8			
CV(%)		57,2614204980092			

...continuação

APÊNDICE 11 - Análise estatística das variáveis porcentagem de grãos de pólen normais, gigantes e inviáveis nas plantas do quarto ciclo de seleção do Experimento 1.

PARÂMETROS GENÉTICOS - Obtidos para genótipos

		VARIÂNCIA
FENOTÍPICA (média)	10,881113	
VARIÂNCIA AMBIENTAL (média)		6,347893
VARIÂNCIA GENOTÍPICA (média)		4,53322
HERDABILIDADE (US : média da família) - %		41,6614
CORRELAÇÃO INTRACLASSE (US : parcela) - %		15,1487
COEF. VARIAÇÃO GENÉTICO (%)		24,1947
RAZÃO CVg/CVe - Média dos genótipos		,4225
NÚMERO MÉDIO DE REPETIÇÕES		4,

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => % pólen inviável

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	1	65,246272	65,246272	,1622	100,0
RESÍDUO	7	2815,563	402,223286		

TOTAL 8 2880,8093

MÉDIA geral 45,0588888888889
CV(%) 44,5095421057694

PARÂMETROS GENÉTICOS - Obtidos para genótipos

VARIÂNCIA FENOTÍPICA (média)	16,311568
VARIÂNCIA AMBIENTAL (média)	100,555821
VARIÂNCIA GENOTÍPICA (média)	,0
HERDABILIDADE (US : média da família) - %	,
CORRELAÇÃO INTRACLASSE (US : parcela) - %	,
COEF. VARIAÇÃO GENÉTICO (%)	,
RAZÃO CVg/CVe - Média dos genótipos	,
NÚMERO MÉDIO DE REPETIÇÕES	4,

MÉDIAS DAS VARIÁVEIS

TRAT	REPET	%NORM	%GIG	%INV
1 (a)	6	46,4900	10,3550	43,1550
2 (b)	3	45,6233	5,6900	48,8667

TRAT=tratamentos;

REPET=repetições;

%NORM= porcentagem de grãos normais;

%GIG= porcentagem de grãos gigantes;

%INV= porcentagem de grãos inviáveis.

APÊNDICE 12 – Produção de pólen gigante, por flor, nas 144 plantas analisadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 2).

Genótipo	Nº grãos gigantes			% total grãos gigantes	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3		
Q5	0	0	0	0	E
Q14	0	0	0	0	E
Q16	6	0	1	0,47	E
Q24	0	0	0	0	E
Q25	21	17	27	4,33	S
Q26	12	15	22	3,27	S
Q37	0	0	0	0	E
Q38	1	0	12	0,87	E
Q41	0	1	1	0,13	E
Q49	0	3	0	0,2	E
Q50	0	0	0	0	E
Q54	38	16	9	4,2	S
Q60	2	1	3	0,4	E
Q61	8	10	16	2,27	S
Q66	0	0	0	0	E
Q94	0	0	0	0	E
Q107	0	2	0	0,13	E
Q115	8	8	13	1,93	S
Q116	0	0	0	0	E
Q122	3	18	13	2,27	S
Q137	0	1	0	0,07	E
Q159	3	18	11	2,13	S
Q175	16	13	27	3,73	S
Q176	11	16	23	3,33	S
Q178	0	22	34	3,73	S
Q189	0	0	0	0	E
Q191	0	0	1	0,07	E
Q194	11	26	39	5,07	S
Q195	0	0	0	0	E
Q198	0	0	3	0,2	E
Q207	0	0	0	0	E
Q213	3	0	0	0,2	E
Q217	1	0	0	0,07	E
Q219	0	0	0	0	E
Q220	3	0	0	0,2	E
Q222	0	0	0	0	E
Q225	0	1	1	0,13	E
Q233	0	0	0	0	E
Q235	0	0	0	0	E
Q252	0	0	0	0	E
Q258	0	2	0	0,13	E
Q259	0	0	0	0	E
Q261	0	0	0	0	E
Q267	4	3	4	0,73	E
Q271	0	0	0	0	E
Q274	36	15	18	4,6	S
Q276	0	1	0	0,07	E

...continuação

APÊNDICE 12 – Produção de pólen gigante, por flor, nas 144 plantas analisadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 2).

Genótipo	Nº grãos gigantes			% total de grãos gigantes	Selecionada (S)/ eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3		
Q282	0	0	1	0,07	E
Q286	0	0	0	0	E
Q295	0	1	0	0,07	E
Q296	14	16	9	2,6	S
Q297	17	20	9	3,07	S
Q301	0	0	0	0	E
Q303	0	0	0	0	E
Q306	0	0	0	0	E
Q313	0	0	0	0	E
Q314	0	2	0	0,13	E
Q315	0	0	0	0	E
Q317	1	0	0	0,07	E
Q322	0	0	2	0,13	E
Q325	18	29	26	4,87	S
Q328	0	0	0	0	E
Q332	0	0	0	0	E
Q337	31	19	15	4,33	S
Q340	1	0	0	0,07	E
Q343	1	1	0	0,13	E
Q346	12	22	11	3	S
Q352	16	20	23	3,93	S
Q358	0	0	0	0	E
Q358	23	15	25	4,2	S
Q359	0	0	0	0	E
Q364	0	0	0	0	E
Q366	0	0	0	0	E
Q368	0	0	0	0	E
Q373	28	25	15	4,53	S
Q381	0	0	0	0	E
Q385	0	0	1	0,07	E
Q414	0	0	0	0	E
R1	13	12	7	2,13	S
R3	19	26	21	4,4	S
R4	13	18	42	4,87	S
R5	23	14	17	3,6	S
R8	0	0	0	0	E
R11	20	12	42	4,93	S
R14	49	23	18	6	S
R15	0	0	3	0,2	E
R16	0	0	0	0	E
R17	0	0	0	0	E
R18	0	0	0	0	E
R20	0	0	0	0	E
R21	0	0	0	0	E
R23	0	0	0	0	E
R27	9	14	12	2,33	S

...continuação

APÊNDICE 12 – Produção de pólen gigante, por flor, nas 144 plantas analisadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 2).

Genótipo	Nº grãos gigantes			% total grãos gigantes	Selecionada (S)/ eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3		
R28	2	1	2	0,33	E
R32	18	25	70	7,53	S
R34	13	10	14	2,47	S
R36	0	0	0	0	E
R37	0	0	0	0	E
R38	0	0	0	0	E
R39	0	0	0	0	E
R40	0	0	0	0	E
R43	0	0	0	0	E
R44	0	2	0	0,13	E
R45	0	0	0	0	E
R46	0	0	0	0	E
R49	19	15	13	3,13	S
R52	4	8	39	3,4	S
R55	13	31	45	5,93	S
R56	12	26	23	4,07	S
R57	0	0	0	0	E
R58	0	0	0	0	E
R59	33	20	17	4,67	S
R60	31	25	32	5,87	S
R61	13	22	48	5,53	S
R62	5	5	11	1,4	S
R72	16	10	29	3,67	S
R87	21	13	13	3,13	S
R108	17	20	12	3,27	S
R109	0	0	0	0	E
K3	0	0	0	0	E
K5	15	19	12	3,07	S
K12	0	0	0	0	E
K15	0	0	0	0	E
K17	23	18	13	3,6	S
K25	0	0	0	0	E
K42	0	0	0	0	E
K45	20	30	35	5,67	S
K46	0	0	0	0	E
K47	0	0	0	0	E
K49	16	13	15	2,93	S
K51	0	0	0	0	E
K52	4	14	16	2,27	S
K66	0	0	0	0	E
K69	0	0	0	0	E
K75	26	17	22	4,33	S
K77	38	18	27	5,53	S
K78	14	15	13	2,8	S
K86	36	14	19	4,6	S

...continuação

APÊNDICE 12 – Produção de pólen gigante, por flor, nas 144 plantas analisadas no primeiro ciclo de seleção (Exp. 2).

Genótipo	Nº grãos gigantes			% total grãos gigantes	Selecionada (S)/ eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3		
K87	13	10	12	2,33	S
K88	10	17	14	2,73	S
K89	0	0	0	0	E
K92	25	16	12	3,53	S
K96	0	0	0	0	E
K97	54	33	21	7,2	S

APÊNDICE 13 - Análise estatística da variável porcentagem de aumento do tamanho dos grãos de pólen gigantes nas plantas do primeiro ciclo de seleção (Exp. 2).

```

=====
Programa GENES          INT. AO ACASO
Arquivo de dados :     A:\c1(ex2).dat
Número de variáveis :   1
Número de genótipos :   3
=====

```

ANALISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => porcentagem de aumento dos grãos

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	2	4,876143	2,438071	,0546	100,0
RESÍDUO	50	2232,4105	44,64821		
TOTAL	52	2237,2866			
MÉDIA geral			27,162641509434		
CV(%)			24,5997120885038		

PARÂMETROS GENÉTICOS - Obtidos para genótipos

VARIÂNCIA FENOTÍPICA (média)	,140454
VARIÂNCIA AMBIENTAL (média)	2,572125
VARIÂNCIA GENOTÍPICA (média)	,0
HERDABILIDADE (US : média da família) - %	,
CORRELAÇÃO INTRACLASSE (US : parcela) - %	,
COEF. VARIAÇÃO GENÉTICO (%)	,
RAZÃO CVg/CVe - Média dos genótipos	,
NÚMERO MÉDIO DE REPETIÇÕES	17,3585

MÉDIAS DAS VARIÁVEIS

TRAT	REPET	% AUMENTO
1 (Q)	20	27,0870
2 (R)	20	27,5125
3 (K)	13	26,7408

TRAT=tratamentos;

REPET=repetições;

%AUMENTO= porcentagem de aumento do tamanho dos grãos gigantes.

APÊNDICE 14 - Análise estatística da variável porcentagem de grãos de pólen gigantes ocorrentes nas plantas selecionadas do primeiro ciclo de seleção (Exp. 2).

Programa GENES	INT. AO ACASO
Arquivo de dados :	A:\c1(ex2).dat
Número de variáveis :	1
Número de genótipos :	3

ANALISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => % de pólen gigante

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	2	3,015205	1,507603	,83	100,0
RESÍDUO	50	90,8201	1,816402		
TOTAL	52	93,8353			
MÉDIA geral		3,85490566037736			
CV(%)		34,9616750143216			

PARÂMETROS GENÉTICOS - Obtidos para genótipos

VARIÂNCIA FENOTÍPICA (média)	,086851
VARIÂNCIA AMBIENTAL (média)	,104641
VARIÂNCIA GENOTÍPICA (média)	,0
HERDABILIDADE (US : média da família) - %	,
CORRELAÇÃO INTRACLASSE (US : parcela) - %	,
COEF. VARIAÇÃO GENÉTICO (%)	,
RAZÃO CVg/CVe - Média dos genótipos	,
NÚMERO MÉDIO DE REPETIÇÕES	17,3585

MÉDIAS DAS VARIÁVEIS

TRAT	REPET	%GIG
1 (Q)	20	3,5695 ± 0,97*
2 (R)	20	4,1665 ± 1,56
3 (K)	13	3,8915 ± 1,48

TRAT=tratamentos;
 REPET=repetições;
 %GIG= porcentagem de grãos de pólen gigantes;
 *média ± desvio padrão.

APÊNDICE 15 – Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes e limites de comprimento e largura dos grãos ocorrentes nas plantas selecionadas das cultivares Q (Quiñiqueli), R (Redland) e K (Keenland) no primeiro ciclo (Exp. 2).

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*
Q25	56,98 - 53,38	55,9-58,05/51,6-55,9	64,03-61,86	60,2-68,8/60,2-64,5
Q26	49,73 - 43,43	47,3-53,75/43,0-49,45	65,75-64,05	62,35-68,8/60,2-66,65
Q54	51,32 - 46,87	47,3-53,75/43,0-51,6	64,74-62,46	60,2-68,8/60,2-64,5
Q61	51,88 - 48,74	43,0-53,75/43,0-51,6	65,38-63,49	62,35-68,8/60,2-64,5
Q115	56,98 - 54,29	53,75-58,05/53,75-58,05	66,25-62,41	58,05-79,55/58,05-75,25
Q122	51,32 - 47,30	47,3-55,9/40,85-51,6	63,58-61,28	60,2-66,65/55,9-64,5
Q159	52,74 - 48,31	49,45-53,75/45,15-51,6	62,80-60,05	58,05-66,65/58,05-64,5
Q175	50,74 - 47,73	45,15-53,75/43,0-51,6	66,28-64,13	62,35-70,95/60,2-68,8
Q176	48,01 - 44,29	43,0-51,6/40,85-47,3	66,65-64,35	64,5-68,8/62,35-66,65
Q178	56,46 - 53,04	53,75-58,05/49,45-58,05	65,79-62,78	60,2-70,95/58,05-66,65
Q194	58,14 - 48,31	47,3-55,9/43,0-51,6	65,90-63,75	60,2-68,8/58,05-66,65
Q274	53,75 - 49,75	51,6-55,9/45,15-51,6	66,35-64,01	64,5-73,1/62,35-70,95
Q296	48,87 - 45,43	43,0-53,75/38,7-51,6	65,51-63,79	62,35-68,8/60,2-66,65
Q297	49,17 - 45,43	47,3-51,6/40,85-49,45	64,50-61,77	62,35-66,65/60,2-64,5
Q325	52,03 - 48,74	49,45-53,75/45,15-51,6	67,90-65,75	64,5-70,95/62,35-68,8
Q337	53,04 - 49,45	49,45-55,9/45,15-53,75	66,26-64,31	60,2-75,25/60,2-70,95
Q346	51,17 - 47,73	49,45-53,75/43,0-51,6	66,50-63,64	64,5-68,8/62,35-66,65
Q352	48,87 - 45,00	45,15-51,6/38,7-49,45	66,65-64,22	64,5-68,8/62,35-66,65
Q358	50,59 - 43,15	47,3-53,75/43,0-51,6	66,44-64,39	64,5-70,95/62,35-66,65
Q373	51,02 - 47,73	45,15-53,75/43,0-51,6	66,65-64,50	64,5-68,8/62,35-66,65
Médias	52,14 - 47,90		65,69-63,35	

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

...continuação

APÊNDICE 15 – Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes e limites de comprimento e largura dos grãos ocorrentes nas plantas selecionadas das cultivares Q (Quiñiqueli), R (Redland) e K (Keenland) no primeiro ciclo (Exp. 2).

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)
R1	51,88-48,59	49,45-55,9/45,15-51,6	66,52-64,50	64,5-70,95/62,35-68,8
R3	51,02-47,45	47,3-53,75/43,0-51,6	67,40-65,04	64,5-70,95/62,35-68,8
R4	53,04-49,02	49,45-55,9/45,15-53,75	64,37-61,28	60,2-64,5/58,05-62,35
R5	50,89-47,73	47,3-53,75/43,0-51,6	65,21-63,36	64,5-66,65/62,35-64,5
R11	51,02-46,59	47,3-53,75/40,85-51,6	65,90-64,07	62,35-68,8/60,2-66,65
R14	54,83-52,14	53,75-55,9/49,45-53,75	63,92-60,35	58,05-68,8/58,05-66,65
R27	51,32-48,74	47,3-53,75/43,0-53,75	64,22-62,07	62,35-64,5/60,2-64,5
R32	51,60-48,59	47,3-53,75/43,0-51,6	71,92-69,21	64,5-90,3/62,35-86,0
R34	49,30-46,16	45,15-51,6/43,0-49,45	65,79-63,36	64,5-68,8/60,2-66,65
R49	49,73-46,16	45,15-53,75/43,0-49,45	66,37-63,64	64,5-68,8/60,2-66,65
R52	49,30-47,73	45,15-53,75/45,15-51,6	63,06-60,35	58,05-77,4/55,9-73,1
R55	52,74-49,17	45,15-53,75/43,0-53,75	68,11-65,27	64,5-75,25/62,35-68,8
R56	49,45-46,44	45,15-51,6/43,0-49,45	65,64-62,93	64,5-66,65/60,2-64,5
R59	58,54-54,24	53,75-60,2/51,6-58,05	66,74-62,89	64,5-73,1/62,35-68,8
R60	51,45-48,01	45,15-53,75/43,0-49,45	65,75-64,05	64,5-68,8/60,2-66,65
R61	53,28-49,15	49,45-55,9/45,15-51,6	66,03-63,38	62,35-68,8/58,05-66,65
R62	51,02-47,88	47,3-53,75/43,0-51,6	66,50-64,80	64,5-68,8/62,35-66,65
R72	50,44-47,45	47,3-53,75/43,0-51,6	65,10-62,95	62,35-68,8/60,2-64,5
R87	53,32-49,60	49,45-55,9/45,15-51,6	64,37-62,61	62,35-66,65/58,05-64,5
R108	50,74-46,72	47,3-53,75/43,0-51,6	64,76-62,97	62,35-68,8/60,2-64,5
Médias	51,75 - 48,38		65,88-63,45	

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

...continuação

APÊNDICE 15 – Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes e limites de comprimento e largura dos grãos ocorrentes nas plantas selecionadas das cultivares Q (Quiñiqueli), R (Redland) e K (Keenland) no primeiro ciclo (Exp. 2).

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)
K5	53,17-50,03	49,45-55,9/47,3-53,75	65,42-62,78	62,35-68,8/60,2-64,5
K17	50,74-46,72	47,3-53,75/43,0-51,6	66,37-64,65	64,5-68,8/62,35-66,65
K45	47,15-49,30	49,45-53,75/47,3-51,6	67,77-65,53	64,5-70,95/62,35-68,8
K49	51,32-46,59	47,3-55,9/43,0-49,45	64,76-61,81	62,35-70,95/58,05-64,5
K52	50,05-46,53	47,3-53,75/43,0-49,45	63,58-60,97	60,2-66,65/58,05-64,5
K75	50,31-46,59	49,45-53,75/43,0-51,6	67,14-64,78	64,5-70,95/62,35-68,8
K77	52,03-48,01	45,15-53,75/43,0-51,6	66,33-64,18	64,5-73,1/60,2-68,8
K78	55,19-53,04	53,75-55,9/51,6-53,75	61,60-57,96	60,2-64,5/55,9-62,35
K86	51,60-47,60	49,45-55,9/45,15-51,6	64,80-62,87	60,2-66,65/58,05-64,5
K87	52,20-48,98	49,45-53,75/47,3-51,6	63,15-64,35	60,2-66,65/58,05-64,5
K88	51,32-48,01	43,0-53,75/40,85-51,6	64,63-63,02	62,35-66,65/60,2-64,5
K92	52,61-49,02	49,45-55,9/47,3-51,6	65,47-63,0	62,35-70,95/60,2-68,8
K97	51,88-48,44	47,3-53,75/45,15-51,6	66,09-64,22	62,35-70,95/60,2-68,8
Médias	51,50-48,37		65,16-63,09	

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

APÊNDICE 16 – Cruzamentos recíprocos realizados no primeiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta mãe	Genitor(es) masculino(s)	Nº flores polinizadas	Sementes coletadas	% de flores polinizadas que produziram sementes
Q25	44*	42	26	61,9
Q25	Q122-Q194	30	32	106,67
Q25	R52	30	17	56,67
Q54	Q61	35	23	65,71
Q54	R4	35	18	51,42
Q159	R61	26	16	61,54
Q159	267	24	23	95,83
Q159	K49-Q274	25	9	36
Q175	R87-289	45	8	17,78
Q178	289*	32	29	90,62
Q178	267*	20	24	120
Q194	R14-R59	30	8	26,67
Q274	Q25	30	54	180
Q337	Q54-225	20	21	105
Q337	R59	12	9	75
Q346	K97	28	11	39,28
R1	K86-R4	40	26	65
R3	R61	30	0	0
R4	Q337-289	20	8	40
R4	289*	25	14	56
R11	R87	38	0	0
R11	R52	14	15	107,14
R14	289*	30	28	93,33
R14	267*	30	65	216,67
R14	Q194-267	30	22	73,33
R14	Q178	25	19	76
R14	289*-K88	20	19	95
R27	R52-K52	18	12	66,67
R27	K52	35	20	57,14

*plantas selecionadas no primeiro ciclo do Experimento 1.

...continuação

APÊNDICE 16 – Cruzamentos recíprocos realizados no primeiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta mãe	Genitor(es) masculino(s)	Nº flores polinizadas	Sementes coletadas	% de flores polinizadas que produziram sementes
R27	Q176-Q274	30	27	90
R49	R32-R60	15	10	71,43
R49	R14	23	21	91,3
R52	R59	20	13	65
R59	289*	22	17	77,27
R59	Q178	25	19	76
R59	R61	20	18	90
R60	R11-K52	20	14	70
R60	Q26-K78	14	18	128,57
R61	267-Q25	30	16	53,33
R62	Q54	20	7	35
R87	267*-Q25	30	26	86,67
K17	Q26	20	0	0
K49	R4-Q337	30	24	80
K49	Q54-R14	30	13	43,33
K49	Q358	25	8	32
K52	R11-R59	20	17	85
K69	Q54	12	2	16,67
K78	150*	14	10	71,43
K78	K69-K97	20	0	0
K86	R11	25	22	88
K86	Q274	24	22	91,67
K86	Q26	25	10	40
K88	K86	30	22	73,33
K88	Q159	18	0	0
K88	R27	40	26	65
Total		1421	958	6742,00%

*plantas selecionadas no primeiro ciclo do Experimento 1.

APÊNDICE 17 – Produção de grãos de pólen gigante, por flor, e viabilidade do pólen nas 106 plantas analisadas no segundo ciclo de seleção (Exp. 2).

Planta	Nº grãos gigantes			% total grãos gigantes	% grãos normais	%grãos inviáveis	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3				
Q25 I1	0	4	0	0,27	95,07	4,66	E
Q54 I1	1	0	0	0,07	95,93	4	E
Q54 I2	1	0	13	0,93	95,07	4	E
Q159 I1	5	6	0	0,73	92,47	6,8	E
Q178 I1	7	14	8	1,93	94,07	4	E
Q178 I2	73	227	1	20,07	74,53	5,4	S
Q274 I1	0	0	0	0	99,2	0,8	E
R1 I1	78	32	4	7,6	89,67	2,73	S
R1 I2	3	0	0	0,2	99,13	0,67	E
R1 I3	7	0	11	1,2	92,13	6,67	E
R4 I1 (NP)	2	0	1	0,2	96,73	3,07	E
R4 I2	337	0	25	24,13	64,07	11,8	S
R4 I3	3	30	429	30,8	30,8	38,4	S
R4 I5	1	5	3	0,6	96,4	3	E
R4 I6 (NP)	34	14	5	3,53	92,73	3,74	S
R4 I11 (NP)	0	2	2	0,27	94,8	4,93	E
R4 I15 (NP)	0	0	0	0	97,33	2,67	E
R4 I7	0	2	8	0,67	94,4	4,93	E
R4 I8	10	3	0	0,87	85,07	14,06	E
R4 I9 (NP)	0	0	0	0	97,07	2,93	E
R4 I13 (NP)	0	0	6	0,4	97,73	1,87	E
R4 I14 (NP)	0	10	0	0,67	98,33	1	E
R4 I18 (NP)	0	0	0	0	99,73	0,27	E
R11 I1	0	0	36	2,4	95,27	2,33	S
R11 I2	5	9	0	0,93	95,47	3,6	E
R11 I3	24	7	0	2,07	94,8	3,13	S
R11 I4	23	3	1	1,8	97,06	1,14	E

I=irmão; NP=não polinizada

...continuação

APÊNDICE 17 – Produção de grãos de pólen gigante, por flor, e viabilidade do pólen nas 106 plantas analisadas no segundo ciclo de seleção (Exp. 2).

Planta	Nº grãos gigantes			% total grãos gigantes	% grãos normais	%grãos inviáveis	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3				
R11 I5	0	2	7	0,6	96,8	2,6	E
R11 I6	0	0	0	0	99,46	0,54	E
R11 I7	13	7	0	1,33	88,8	9,87	E
R11 I8	5	17	0	1,46	98,4	0,14	E
R11 I9	0	0	36	2,4	91,4	6,2	S
R11 I10	10	18	21	3,27	94,47	2,26	S
R14 I1	36	0	50	5,73	90,53	3,74	S
R14 I2	17	57	0	4,93	90,6	4,47	S
R14 I3	5	31	16	3,47	90,27	6,26	S
R14 I4	0	8	0	0,53	88,47	11	E
R14 I5	1	0	1	0,13	98,47	1,4	E
R14 I6	0	0	0	0	97	3	E
R14 I12	65	112	48	15	84,54	0,46	S
R14 I15	83	4	0	5,8	90,47	3,73	S
R14 I16	9	0	5	0,93	96,27	2,8	E
R14 I17	0	1	11	0,8	99,13	0,07	E
R14 I19	0	137	2	9,27	86,93	3,8	S
R14 I21	1	0	0	0,07	94,2	5,73	E
R14 I22	7	0	0	0,47	99,06	0,47	E
R14 I23	5	4	25	2,27	88	9,73	S
R14 I25	25	8	11	2,93	95,87	1,2	S
R14 I26	7	0	23	2	95,53	2,47	S
R14 I29	0	6	0	0,4	95,87	3,73	E
R27 I1	12	13	0	1,67	96,13	2,2	E
R27 I2	12	12	33	3,8	94,6	1,6	S
R27 I3	1	14	0	1	96,33	2,67	E

I=irmão; NP=não polinizada

...continuação

APÊNDICE 17 – Produção de grãos de pólen gigante, por flor, e viabilidade do pólen nas 106 plantas analisadas no segundo ciclo de seleção (Exp. 2).

Planta	Nº grãos gigantes			% total grãos gigantes	% grãos normais	%grãos inviáveis	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3				
R27 I4	12	0	8	1,33	97,74	0,93	E
R27 I5	0	2	0	0,13	97,93	1,94	E
R27 I6	4	0	0	0,27	98,8	0,93	E
R27 I7	0	0	1	0,07	99,6	0,33	E
R27 I9	20	3	7	2	96,54	1,46	S
R27 I10	0	0	0	0	99,6	0,4	E
R27 I11	426	332	7	51	48,46	0,54	S
R27 I12	0	0	1	0,07	94,33	5,6	E
R27 I13	0	1	74	5	92,13	2,87	S
R27 I15	21	5	0	1,73	98,07	0,2	E
R27 I16	17	0	0	1,13	97,13	1,74	E
R49 I1	0	1	7	0,53	98,87	0,6	E
R59 I1	33	103	0	9,07	89,33	1,6	S
R59 I2	0	32	4	2,4	96,33	1,27	S
R59 I3	2	71	12	5,67	89,4	4,93	S
R59 I4	45	36	6	5,8	93,6	0,6	S
R59 I8	15	5	10	2	97,53	0,47	S
R59 I9	17	18	20	3,66	94,8	1,54	S
R59 I10	2	0	2	0,27	97,86	1,87	E
R59 I11	46	3	0	3,27	82,87	13,86	S
R60 I1	42	2	0	2,93	96,33	0,74	S
R60 I2	0	1	0	0,07	97,33	2,6	E
R60 I3	6	9	41	3,73	90,33	5,94	S
R60 I4	1	0	0	0,07	99,33	0,6	E
R60 I5	0	0	23	1,53	87,67	10,8	E
R60 I6	24	0	1	1,67	96,33	2	E

I=irmão; NP=não polinizada

...continuação

APÊNDICE 17 – Produção de grãos de pólen gigante, por flor, e viabilidade do pólen nas 106 plantas analisadas no segundo ciclo de seleção (Exp. 2).

Planta	Nº grãos gigantes			% total grãos gigantes	% grãos normais	%grãos inviáveis	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
	Flor 1	Flor 2	Flor 3				
R27 I4	12	0	8	1,33	97,74	0,93	E
R27 I5	0	2	0	0,13	97,93	1,94	E
R27 I6	4	0	0	0,27	98,8	0,93	E
R27 I7	0	0	1	0,07	99,6	0,33	E
R27 I9	20	3	7	2	96,54	1,46	S
R27 I10	0	0	0	0	99,6	0,4	E
R27 I11	426	332	7	51	48,46	0,54	S
R27 I12	0	0	1	0,07	94,33	5,6	E
R27 I13	0	1	74	5	92,13	2,87	S
R27 I15	21	5	0	1,73	98,07	0,2	E
R27 I16	17	0	0	1,13	97,13	1,74	E
R49 I1	0	1	7	0,53	98,87	0,6	E
R59 I1	33	103	0	9,07	89,33	1,6	S
R59 I2	0	32	4	2,4	96,33	1,27	S
R59 I3	2	71	12	5,67	89,4	4,93	S
R59 I4	45	36	6	5,8	93,6	0,6	S
R59 I8	15	5	10	2	97,53	0,47	S
R59 I9	17	18	20	3,66	94,8	1,54	S
R59 I10	2	0	2	0,27	97,86	1,87	E
R59 I11	46	3	0	3,27	82,87	13,86	S
R60 I1	42	2	0	2,93	96,33	0,74	S
R60 I2	0	1	0	0,07	97,33	2,6	E
R60 I3	6	9	41	3,73	90,33	5,94	S
R60 I4	1	0	0	0,07	99,33	0,6	E
R60 I5	0	0	23	1,53	87,67	10,8	E
R60 I6	24	0	1	1,67	96,33	2	E

I=irmão; NP=não polinizada

APÊNDICE 18 - Análise estatística da variável porcentagem de aumento de tamanho dos grãos de pólen gigantes nas plantas do segundo ciclo de seleção (Exp. 2).

```

=====
Programa GENES          INT. AO ACASO
Arquivo de dados :     A:\c2-exp2.dat
Número de variáveis :   1
Número de genótipos :  12
=====

```

ANALISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => porcentagem de aumento dos grãos

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	11	204,096222	18,554202	,9425	100,0
RESÍDUO	31	610,2587	19,685765		
TOTAL	42	814,3549			
MÉDIA geral			20,7813953488372		
CV(%)			21,350174960152		

PARÂMETROS GENÉTICOS - Obtidos para genótipos

VARIÂNCIA FENOTÍPICA (média)	5,417369
VARIÂNCIA AMBIENTAL (média)	5,747757
VARIÂNCIA GENOTÍPICA (média)	,0
HERDABILIDADE (US : média da família) - %	,
CORRELAÇÃO INTRACLASSE (US : parcela) - %	,
COEF. VARIAÇÃO GENÉTICO (%)	,
RAZÃO CVg/CVe - Média dos genótipos	,
NÚMERO MÉDIO DE REPETIÇÕES	3,4249

MÉDIAS DAS VARIÁVEIS

TRAT	REPET	% AUMENTO
1 (Q)	1	17,8800
2 (A)	1	17,5700
3 (B)	2	17,0650
4 (C)	4	23,0500
5 (D)	9	18,7700
6 (G)	4	23,5850
7 (E)	7	20,5286
8 (F)	2	18,9300
9 (O)	1	25,4700
10 (H)	2	18,8950
11 (I)	4	21,3075
12 (J)	6	23,0833

TRAT=tratamentos;

REPET=repetições;

%AUMENTO= porcentagem de aumento de tamanho dos grãos gigantes.

APÊNDICE 19 - Tamanho médio dos grãos normais e gigantes e limites de comprimento e largura dos grãos ocorrentes nas plantas selecionadas do segundo ciclo (Exp. 2).

Plantas selecionadas	Identificação	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*
R1 I1	A1	51,39-47,52	45,15-53,75/43,0-51,6	60,42-56,8	58,05-64,5/55,9-58,05
R4 I2	B5	50,80-49,30	45,15-53,75/43,0-51,6	62,57-55,5	60,2-68,8/55,9-58,05
R4 I3	B6	54,83-50,53	49,45-58,05/47,3-53,75	60,85-56,3	58,05-64,5/55,9-58,05
R4 I6 NP		52,00-48,16	47,3-53,75/45,15-51,6	63,64-59,3	60,2-66,65/58,05-64,5
R11 I1	C12	50,68-47,58	45,15-51,6/43,0-51,6	62,57-59,8	60,2-64,5/58,05-64,5
R11 I3	C14	49,73-48,16	47,3-51,6/45,15-51,6	61,49-58,9	58,05-64,5/58,05-60,2
R11 I9	C20	50,31-47,15	45,15-51,6/40,85-51,6	61,92-58,9	58,05-64,5/55,9-62,35
R11 I10	C21	49,51-46,66	45,15-51,6/40,85-49,45	60,42-58,9	58,05-62,35/58,05-60,2
R14 I1	D22	53,28-50,03	47,3-55,9/45,15-53,75	63,21-59,8	58,05-66,65/58,05-64,5
R14 I2	D23	53,38-52,40	47,3-53,75/47,3-53,75	62,35-60,2	58,05-68,8/58,05-64,5
R14 I3	D24	52,83-51,45	49,45-53,75/47,3-53,75	61,28-58,7	58,05-68,8/58,05-64,5
R14 I12	D33	53,00-50,48	49,45-53,75/47,3-53,75	64,07-60,8	62,35-68,8/58,05-64,5
R14 I15	D36	52,98-50,37	49,45-53,75/47,3-51,6	61,28-58,1	60,2-62,35/55,9-60,2
R14 I19	D40	51,88-49,67	49,45-53,75/47,3-51,6	63,43-60,0	58,05-64,5/58,05-64,5
R14 I23	D44	50,68-49,30	47,3-53,75/47,3-51,6	61,92-58,5	60,2-62,35/55,9-60,2
R14 I25	D46	51,97-49,17	47,3-53,75/45,15-51,6	62,14-58,7	60,2-64,5/58,05-62,35
R14 I26	D47	51,11-49,82	47,3-53,75/45,15-51,6	59,77-57,2	58,05-62,35/55,9-60,2
R59 I1	E48	53,54-51,97	47,3-53,75/47,3-53,75	61,49-57,6	58,05-64,5/55,9-64,5
R59 I2	E49	50,31-48,74	47,3-53,75/45,15-51,6	61,06-58,1	58,05-64,5/55,9-60,2
R59 I3	E50	49,73-46,59	47,3-51,6/43,0-49,45	59,13-57,4	58,05-64,5/55,9-64,5
R59 I4	E51	51,88-48,74	49,45-53,75/45,15-51,6	64,93-58,9	60,2-68,8/58,05-62,35
R59 I8	E55	51,88-49,60	49,45-53,75/47,3-53,75	65,15-60,0	58,05-73,1/58,05-64,5
R59 I9	E56	53,81-49,86	49,45-55,9/47,3-51,6	64,07-58,5	62,35-66,65/58,05-64,5
R59 I11	E58	52,09-49,24	49,45-53,75/45,15-51,6	61,92-60,8	58,05-68,8/58,5-64,5

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente; I=irmão.

...continuação

APÊNDICE 19 - Tamanho médio dos grãos normais e gigantes e limites de comprimento e largura dos grãos ocorrentes nas plantas selecionadas do segundo ciclo (Exp. 2).

Plantas selecionadas	Identificação	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*
R60 I1	F59	50,74-49,67	49,45-53,75/47,3-53,75	61,49-59,3	58,05-64,5/58,05-64,5
R60 I3	F61	55,53-52,40	53,75-55,9/49,45-53,75	64,72-60,2	60,2-68,8/58,05-625,35
R27 I2	G69	50,16-48,59	47,3-53,75/45,15-51,6	63,86-60,8	58,05-70,95/55,9-64,5
R27 I9	G76	45,37-42,53	40,85-47,3/38,7-43,0	58,91-56,1	58,05-60,2/55,9-58,05
R27 I11	G78	56,76-50,74	45,15-58,05/45,15-51,6	65,15-59,8	62,35-73,1/58,05-66,65
R27 I13	G80	49,88-45,09	45,15-51,6/43,0-51,6	61,06-58,7	60,2-62,35/58,05-60,2
K78 I1	H85	53,26-48,44	49,45-53,75/45,15-53,75	61,28-57,8	58,05-64,5/55,9-60,2
K78 I4	H88	52,03-48,65	47,3-53,75/47,3-49,45	63,86-57,8	58,05-68,8/55,9-62,35
K86 I1	I89	52,59-51,30	49,45-55,9/47,3-53,75	63,86-58,9	62,35-68,8/58,05-64,5
K86 I3	I91	50,89-47,67	45,15-53,75/40,85-51,6	63,43-58,1	62,35-64,5/58,05-58,05
K86 I4	I92	53,17-49,67	49,45-53,75/45,15-53,75	61,49-58,9	58,05-64,5/58,05-62,35
K86 I8	I96	49,60-48,44	45,15-51,6/45,15-51,6	61,28-58,1	58,05-64,5/58,05-60,2
K88 I3	J99	53,64-48,63	51,6-55,9/45,15-49,45	61,49-57,0	60,2-64,5/53,75-60,2
K88 I4	J100	50,37-46,59	45,15-53,75/43,0-49,45	60,85-55,7	60,2-64,5/53,75-60,2
K88 I5	J101	51,23-49,45	49,45-55,9/45,15-51,6	67,30-64,5	62,35-73,1/60,2-68,8
K88 I6	J102	53,32-49,73	49,45-55,9/47,3-53,75	64,50-63,6	60,2-68,8/58,05-64,5
K88 I8	J104	51,90-49,21	43,0-55,9/43,0-53,75	66,44-60,4	62,35-68,8/58,05-64,5
K88 I9	J105	50,96-47,79	47,3-53,75/45,15-51,6	62,57-59,3	58,05-66,65/58,05-62,35
K52 I 2	O115	51,23-48,22	47,3-53,75/45,15-51,6	64,29-59,8	62,35-70,95-58,05-62,35
Q178 I2	Q119	54,35-50,68	47,3-55,9/47,3-51,6	64,07-59,6	60,2-68,8/58,05-64,5
Médias		51,83-48,99		62,56-58,91	

*as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente; I=irmão.

APÊNDICE 20 - Análise estatística da variável porcentagem de grãos de pólen gigantes nas plantas selecionadas do segundo ciclo de seleção (Exp. 2).

Programa GENES	INT. AO ACASO
Arquivo de dados :	A:\c2-exp2.dat
Número de variáveis :	1
Número de genótipos :	12

ANALISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => % grãos gigantes

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	11	1483,978913	134,907174	2,1429	,047017
RESÍDUO	31	1951,6003	62,954848		
TOTAL	42	3435,5792			
MÉDIA geral		7,60604651162791			
CV(%)		104,317126210039			

PARÂMETROS GENÉTICOS - Obtidos para genótipos

VARIÂNCIA FENOTÍPICA (média)	39,389562
VARIÂNCIA AMBIENTAL (média)	18,381261
VARIÂNCIA GENOTÍPICA (média)	21,008302
HERDABILIDADE (US : média da família) - %	53,3347
CORRELAÇÃO INTRACLASSE (US : parcela) - %	25,0209
COEF. VARIAÇÃO GENÉTICO (%)	60,261
RAZÃO CVg/CVe - Média dos genótipos	,5777
NÚMERO MÉDIO DE REPETIÇÕES	3,4249

MÉDIAS DAS VARIÁVEIS

TRAT	REPET	%GIG
1 (Q)	1	20,0700 .
2 (A)	1	7,6000 .
3 (B)	2	27,4650 ± 4,71*
4 (C)	4	2,5350 ± 0,51
5 (D)	9	5,7111 ± 4,15
6 (G)	4	15,4500 ± 23,73
7 (E)	7	4,5529 ± 2,47
8 (F)	2	3,3300 ± 0,56
9 (O)	1	4,4700 .
10 (H)	2	8,0950 ± 4,48
11 (I)	4	4,2000 ± 2,17
12 (J)	6	7,5217 ± 2,76

TRAT=tratamentos;

REPET=repetições;

%GIG= porcentagem de grãos gigantes;

*média ± desvio padrão;

. = resultados sem desvio padrão (apenas uma observação).

APÊNDICE 21- Cruzamentos recíprocos realizados no segundo ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta mãe	Identificação	Genitor(es) masculino(s)	Nº flores polinizadas	Nº sementes coletadas	% flores polinizadas que produziram sementes
R1 I1	A1	J99	21	16	76,19
	A1	G69	24	17	70,83
	A1	G76	30	28	93,33
R4 I2	B5	E55	20	5	25
R4 I3	B6	E50	20	15	60
	B6	D47	20	13	65
	B6	Q119	15	3	20
	B6	H85	20	14	70
R11 I3	C14	G69	20	16	80
	C14	E50	15	3	20
	C14	C20	30	14	46,67
R11 I9	C20	I89	40	27	67,5
	C20	E48	20	19	95
R14 I1	D22	G76	16	10	62,5
	D22	J104	22	15	68,18
	D22	Q119	12	3	25
R14 I3	D24	H85	15	13	86,67
	D24	D47	25	19	76
R14 I15	D36	C14-H88	30	3	10
	D36	J105	20	6	30
R14 I19	D40	E50	50	0	0
	D40	C14	40	26	65
R14 I26	D47	G76	20	17	85
R59 I1	E48	E50	30	22	73,33
	E48	C20	50	14	28
	E48	J99	33	25	75,76
	E48	C14	32	24	75

I=irmão.

...continuação

APÊNDICE 21- Cruzamentos recíprocos realizados no segundo ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta mãe	Identificação	Genitor(es) masculino(s)	Nº flores polinizadas	Nº sementes coletadas	% flores polinizadas que produziram sementes
R59 I3	E50	F61	40	23	57,5
	E50	A1	35	23	65,71
	E50	D40	35	1	2,86
	E50	B6	17	13	76,47
	E50	E55	30	13	43,33
	E50	Q119	30	3	10
	E50	C20	22	0	0
R59 I8	E55	Q119	25	15	60
R60 I1	F59	D33	30	11	36,67
R60 I3	F61	H85	26	23	88,46
	F61	E55	30	3	10
R27 I2	G69	J102	12	12	100
	G69	G76	18	16	88,89
	G69	Q119	12	9	75
R27 I9	G76	D22-F61	25	19	76
	G76	D23	25	18	72
	G76	H88	26	26	100
	G76	D47	10	7	70
R27 I11	G78	E55	40	10	25
	G78	C20	23	6	26,09
R27 I13	G80	E51	30	6	20
	G80	A2	20	19	95
K78 I1	H85	Q119	12	6	50
	H85	D36	23	12	52,17
	H85	D24	23	7	30,43
K78 I4	H88	J104	40	22	55
	H88	G76	20	17	85

I=irmão.

...continuação

APÊNDICE 21- Cruzamentos recíprocos realizados no segundo ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta mãe	Identificação	Genitor(es) masculino(s)	Nº flores polinizadas	Nº sementes coletadas	% flores polinizadas que produziram sementes
K86 I1	I89	J100	18	0	0
K86 I4	I92	J102	35	20	57,14
K88 I3	J99	H88	40	27	67,5
	J99	C21	25	11	44
K88 I4	J100	J104	21	13	61,9
	J100	E55	25	23	92
	J100	C20	30	29	96,67
K88 I6	J102	H88	35	20	57,14
K88 I8	J104	E50	20	18	90
	J104	D24	21	10	47,62
K88 I9	J105	H88	28	21	75
Q178 I2	Q119	J104	30	32	106,67
	Q119	H85	25	24	96
	Q119	J102	30	0	0
Total			1752	975	55,65

APÊNDICE 22 – Produção de grãos de pólen, por flor, e viabilidade dos grãos nas 200 plantas analisadas no terceiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta	Irmão	Número de grãos gigantes			% total grãos gigantes	% grãos normais	% grãos inviáveis	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
		Flor 1	Flor 2	Flor 3				
A1	2	7	0	0	0,47	97,4	2,13	E
A1	3	6	6	0	0,8	96,2	3	E
A1	4	0	0	0	0	97,67	2,33	E
A1	6	16	10	47	4,87	91,2	3,93	S
A1	7	0	0	0	0	97,67	2,33	E
A1	13	0	0	0	0	95,67	4,33	E
B6	1	4	4	0	0,53	72,8	26,67	E
B6	2	12	0	0	0,8	97,6	1,6	E
B6	3	0	0	0	0	97,67	2,33	E
B6	4	0	9	0	0,6	57	42,4	E
B6	5	1	2	5	0,53	66,13	33,34	E
B6	6	2	0	0	0,13	91,8	8,07	E
B6	7	0	0	0	0	97,53	2,47	E
B6	8	46	4	1	3,4	83,2	13,4	S
B6	9	18	0	0	1,2	62,53	36,27	E
B6	15	0	0	21	1,4	97,53	1,07	E
B6	17	3	4	0	0,47	91,87	7,66	E
B6	18	0	0	0	0	96,13	3,87	E
B6	19	2	1	7	0,67	65,07	34,26	E
C14	2	0	0	0	0	96,13	3,87	E
C14	7	0	36	0	2,4	92,07	5,53	E
C14	8	2	0	3	0,33	95,6	4,07	E
C14	9	0	0	0	0	94,4	5,6	E
C14	11	0	8	0	0,53	95,8	3,67	E
C14	17	0	0	0	0	97,87	2,13	E
C20	4	9	24	18	3,4	93,4	3,2	S
C20	8	0	3	2	0,33	96,8	2,87	E

...continuação

APÊNDICE 22 – Produção de grãos de pólen, por flor, e viabilidade dos grãos nas 200 plantas analisadas no terceiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta	Irmão	Número de grãos gigantes			% total grãos gigantes	% grãos normais	% grãos inviáveis	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
		Flor 1	Flor 2	Flor 3				
C20	9	0	0	0	0	97,4	2,6	E
C20	11	0	2	9	0,73	95,6	3,67	E
D22	1	4	1	0	0,33	98,07	1,6	E
D22	3	9	3	1	0,87	78,2	20,93	E
D22	4	5	0	0	0,33	95,4	4,27	E
D22	6	0	0	0	0	96,4	3,6	E
D22	8	0	0	0	0	96,4	3,6	E
D22	10	1	0	0	0,07	95,87	4,06	E
D22	11	50	0	0	3,33	93,53	3,14	S
D22	13	58	16	14	5,87	90,87	3,26	S
D24	2	3	6	0	0,6	96,73	2,67	E
D24	3	0	0	0	0	93,47	6,53	E
D24	5	5	3	0	0,53	97,67	1,8	E
D24	7	4	2	6	0,8	95,4	3,8	E
D24	8	0	0	0	0	98,6	1,4	E
D40	3	3	28	52	5,53	88,6	5,87	S
D40	4	0	0	0	0	95,47	4,53	E
D40	7	6	0	0	0,4	98,67	0,93	E
D40	8	4	0	1	0,33	77,33	22,34	E
D40	9	50	40	45	9	57,8	33,2	S
D40	12	2	10	5	1,13	93,6	5,27	E
D40	16	9	24	28	4,07	60,67	35,26	S
D40	18	0	0	102	6,8	89,53	3,67	S
D40	22	9	9	4	1,47	97,87	0,66	E
D47	2	223	7	20	16,67	82,2	1,13	S
D47	6	1	10	0	0,73	94,87	4,4	E

...continuação

APÊNDICE 22 – Produção de grãos de pólen, por flor, e viabilidade dos grãos nas 200 plantas analisadas no terceiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta	Irmão	Número de grãos gigantes			% total grãos gigantes	% grãos normais	% grãos inviáveis	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
		Flor 1	Flor 2	Flor 3				
E48	2	0	0	1	0,07	98,87	1,06	E
E48	4	10	3	5	1,2	96,2	2,6	E
E48	9	2	4	0	0,4	90,73	8,87	E
E48	11	84	67	68	14,6	76,07	9,33	S
E48	12	0	0	0	0	99,33	0,67	E
E48	15	31	16	1	3,2	93,87	2,93	S
E48	16	74	14	2	6	91	3	S
E48	21	10	9	0	1,27	96,13	2,6	E
E48	23	1	5	2	0,53	93,47	6	E
E48	26	15	8	10	2,2	95,33	2,47	E
E48	28	26	17	4	3,13	93,4	3,47	S
E48	33	126	6	5	9,13	88,27	2,6	S
E48	35	11	0	0	0,73	68,93	30,34	E
E48	37	5	1	3	0,6	98,13	1,27	E
E48	42	1	0	0	0,07	99	0,93	E
E48	43	3	0	6	0,6	96,27	3,13	E
E48	44	16	29	30	5	93,6	1,4	S
E48	47	104	139	1	16,27	71,13	12,6	S
E48	48	92	3	17	7,47	91,07	1,46	S
E48	51	0	1	0	0,07	97,4	2,53	E
E48	52	55	0	0	3,67	91,2	5,13	S
E48	53	0	2	0	0,13	96,4	3,47	E
E48	54	67	0	0	4,47	90,67	4,86	S
E48	56	23	9	0	2,13	94,33	3,54	E
E48	62	19	0	7	1,73	96,73	1,54	E
E48	63	10	4	12	1,73	94	4,27	E

...continuação

APÊNDICE 22 – Produção de grãos de pólen, por flor, e viabilidade dos grãos nas 200 plantas analisadas no terceiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta	Irmão	Número de grãos gigantes			% total grãos gigantes	% grãos normais	% grãos inviáveis	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
		Flor 1	Flor 2	Flor 3				
E48	64	1	0	0	0,07	99,2	0,73	E
E48	68	0	0	0	0	96,87	3,13	E
E48	69	10	2	33	3	91,53	5,47	S
E48	70	244	172	52	31,2	66,87	1,93	S
E48	71	0	5	9	0,93	94,2	4,87	E
E48	73	39	7	6	3,47	54,27	42,26	S
E50	1	32	7	1	2,67	94,2	3,13	E
E50	6	22	6	23	3,4	87,34	9,26	S
E50	12	4	1	14	1,27	95,73	3	E
E50	15	30	0	1	2,07	39,13	58,8	E
E50	17	52	5	0	3,8	92,6	3,6	S
E50	21	16	11	5	2,13	95,27	2,6	E
E50	23	0	3	3	0,4	98,33	1,27	E
E50	24	0	8	8	1,07	95,93	3	E
E50	27	2	0	0	0,13	98,8	1,07	E
E50	28	14	15	17	3,07	93,8	3,13	S
E55	4	7	12	1	1,33	92,47	6,2	E
E55	10	9	17	26	3,47	88,2	8,33	S
E55	11	2	0	0	0,13	96	3,87	E
E55	13	1	0	45	3,07	91,33	5,6	S
E55	14	28	0	0	1,87	93,47	4,66	E
E55	15	5	29	19	3,53	91,34	5,13	S
E55	5	0	0	0	0,33	97,8	1,87	E
E55	18	0	0	0	0	92,2	7,8	E
E55	23	0	5	0	0,33	97,67	2	E
E55	29	2	0	3	0,33	95,93	3,74	E

...continuação

APÊNDICE 22 – Produção de grãos de pólen, por flor, e viabilidade dos grãos nas 200 plantas analisadas no terceiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta	Irmão	Número de grãos gigantes			% total grãos gigantes	% grãos normais	% grãos inviáveis	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
		Flor 1	Flor 2	Flor 3				
E55	31	22	10	21	3,53	66,87	29,6	S
E55	32	68	10	8	5,73	92,2	2,07	S
F61	2	0	0	0	0	97,67	2,33	E
F61	7	12	0	0	0,8	97,73	1,47	E
F61	8	0	33	0	2,2	94,6	3,2	E
F61	10	13	11	0	1,6	95,6	2,8	E
F61	12	0	0	0	0	95,73	4,27	E
F61	14	9	25	11	3	95,27	1,73	S
F61	15	92	64	54	14	80,53	5,47	S
F61	16	1	0	0	0,07	99,27	0,66	E
F61	17	10	2	0	0,8	98,6	0,6	E
G69	2	0	0	0	0	98,27	1,73	E
G69	3	0	83	8	6,07	91,87	2,06	S
G69	6	12	0	0	0,8	97,13	2,07	E
G69	9	54	56	0	7,33	88,4	4,27	S
G69	11	11	5	5	1,4	95,8	2,8	E
G69	18	0	0	0	0	98,6	1,4	E
G69	24	111	81	0	12,8	86,73	0,47	S
G76	1	11	0	0	0,73	96,07	3,2	E
G76	2	0	0	0	0	95	5	E
G76	16	10	17	32	3,93	90,07	6	S
G78	2	352	155	194	46,73	46,73	6,54	S
G78	3	0	12	0	0,8	92	7,2	E
G78	5	416	53	55	34,93	33,67	31,4	S
G78	15	39	10	0	3,27	95,2	1,53	S
G78	19	1	3	0	0,27	97,2	2,53	E

...continuação

APÊNDICE 22 – Produção de grãos de pólen, por flor, e viabilidade dos grãos nas 200 plantas analisadas no terceiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta	Irmão	Número de grãos gigantes			% total grãos gigantes	% grãos normais	% grãos inviáveis	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
		Flor 1	Flor 2	Flor 3				
H85	4	8	0	0	0,53	95,33	4,14	E
H85	9	6	1	0	0,47	84,8	14,73	E
H85	10	174	24	25	14,87	79,47	5,66	S
H85	12	0	0	2	0,13	98,33	1,54	E
H85	13	0	0	0	0	95,8	4,2	E
H88	7	0	0	0	0	95,93	4,07	E
J99	1	0	0	3	0,2	97,53	2,27	E
J99	2	0	0	2	0,13	96,2	3,67	E
J99	3	0	0	0	0	98,87	1,13	E
J99	5	1	0	0	0,07	95,4	4,53	E
J99	7	1	0	0	0,07	97,4	2,53	E
J99	8	0	0	0	0	96,27	3,73	E
J99	13	0	0	0	0	96,6	3,4	E
J99	14	221	169	31	28,07	69,67	2,26	S
J100	1	2	0	1	0,2	99	0,8	E
J100	2	137	21	11	11,27	84,6	4,13	S
J100	4	13	0	0	0,87	98,47	0,66	E
J100	10	13	0	0	0,87	89,8	9,33	E
J100	12	1	0	0	0,07	97,8	2,13	E
J100	13	0	0	0	0	98,53	1,47	E
J100	14	8	0	0	0,53	92,47	7	E
J100	15	0	0	0	0	93,53	6,47	E
J100	17	0	2	0	0,13	94,2	5,67	E
J100	19	9	5	0	0,93	96,07	3	E
J100	20	0	0	0	0	98,33	1,67	E
J100	23	3	0	0	0,2	93,73	6,07	E

...continuação

APÊNDICE 22 – Produção de grãos de pólen, por flor, e viabilidade dos grãos nas 200 plantas analisadas no terceiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta	Irmão	Número de grãos gigantes			% total grãos gigantes	% grãos normais	% grãos inviáveis	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
		Flor 1	Flor 2	Flor 3				
J100	24	5	0	0	0,33	96,4	3,27	E
J100	28	6	1	13	1,33	93,07	5,6	E
J100	29	0	7	7	0,93	93,53	5,54	E
J100	30	28	0	19	3,13	92,93	3,94	S
J100	32	0	26	30	3,73	90,93	5,34	S
J100	33	1	0	1	0,13	97	2,87	E
J100	34	2	0	41	2,87	37,73	59,4	E
J100	35	100	3	31	8,93	88,07	3	S
J100	36	8	0	7	1	62,73	36,27	E
J100	37	85	6	0	6,07	84,46	9,47	S
J100	43	3	2	0	0,33	92	7,67	E
J102	2	1	0	0	0,07	75,27	24,66	E
J102	3	0	0	0	0	96,47	3,53	E
J102	4	0	0	0	0	98,67	1,33	E
J102	9	0	0	8	0,53	96,87	2,6	E
J102	10	33	5	3	2,73	95,6	1,67	E
J102	11	0	0	0	0	99,07	0,93	E
J102	12	9	1	3	0,87	97,93	1,2	E
J104	1	9	3	0	0,8	80,53	18,67	E
J104	3	0	0	0	0	99	1	E
J104	4	26	60	2	5,87	78,93	15,2	S
J104	7	4	0	0	0,27	51,53	48,2	E
J104	9	3	0	2	0,33	97,13	2,54	E
Q119	1	0	0	2	0,13	96	3,87	E
Q119	2	0	10	4	0,93	96	3,07	E
Q119	4	5	0	0	0,33	89,6	10,07	E

...continuação

APÊNDICE 22 – Produção de grãos de pólen, por flor, e viabilidade dos grãos nas 200 plantas analisadas no terceiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta	Irmão	Número de grãos gigantes			% total grãos gigantes	% grãos normais	% grãos inviáveis	Selecionada (S)/ Eliminada (E)
		Flor 1	Flor 2	Flor 3				
Q119	5	0	2	1	0,2	83,73	16,07	E
Q119	7	36	6	5	3,13	96	0,87	S
Q119	9	31	15	15	4,07	83,67	12,26	S
Q119	11	1	0	51	3,47	74,6	21,93	S
Q119	14	30	7	8	3	87,33	9,67	S
Q119	15	0	0	0	0	86,2	13,8	E
Q119	16	13	6	0	1,27	85,67	13,06	E
Q119	17	0	89	12	6,73	91,07	2,2	S
Q119	18	23	3	8	2,27	91,67	6,06	E
Q119	20	0	1	5	0,4	94,47	5,13	E
Q119	23	0	0	0	0	92,8	7,2	E
Q119	24	11	41	39	6,07	91	2,93	S
Q119	25	1	6	1	0,53	90,2	9,27	E
Q119	27	0	0	0	0	95,93	4,07	E
Q119	28	86	3	119	13,87	82,2	3,93	S
Q119	30	0	6	15	1,4	93,2	5,4	E
Q119	32	0	0	0	0	97,47	2,53	E

APÊNDICE 23 - Análise estatística da variável porcentagem de aumento de tamanho dos grãos de pólen gigantes nas plantas selecionadas do terceiro ciclo de seleção (Exp. 2).

```

=====
Programa GENES          INT. AO ACASO
Arquivo de dados :     A:\exp2-c3-novo.dat
Número de variáveis :   1
Número de genótipos :  18
=====

```

ANALISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => % aumento

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	17	1135,892516	66,817207	,9632	100,0
RESÍDUO	36	2497,2094	69,366928		
TOTAL	53	3633,1019			
MÉDIA geral			23,8985185185185		
CV(%)			34,8501980499194		

PARÂMETROS GENÉTICOS - Obtidos para genótipos

VARIÂNCIA FENOTÍPICA (média)	23,609776
VARIÂNCIA AMBIENTAL (média)	24,510717
VARIÂNCIA GENOTÍPICA (média)	,0
HERDABILIDADE (US : média da família) - %	,
CORRELAÇÃO INTRACLASSE (US : parcela) - %	,
COEF. VARIAÇÃO GENÉTICO (%)	,
RAZÃO CVg/CVe - Média dos genótipos	,
NÚMERO MÉDIO DE REPETIÇÕES	2,8301

MÉDIAS DAS VARIÁVEIS

TRAT	REPET	%AUMENTO
1 (A1)	1	29,5800
2 (B6)	1	34,1600
3 (C20)	1	29,9500
4 (D22)	2	27,2900
5 (D40)	4	26,6975
6 (D47)	1	27,5800
7 (G69)	3	30,9233
8 (G76)	1	21,7000
9 (G78)	3	18,3700
10 (E48)	13	25,4969
11 (E50)	3	20,0067
12 (E55)	4	13,8325
13 (F61)	2	25,2600
14 (H85)	1	22,4800
15 (J99)	1	18,3700
16 (J100)	5	19,4140
17 (J104)	1	22,3000
18 (Q119)	7	25,8214

TRAT=tratamentos;

REPET=repetições;

%AUMENTO= porcentagem de aumento de tamanho dos grãos gigantes.

APÊNDICE 24 - Análise estatística da variável porcentagem de grãos de pólen gigantes nas plantas selecionadas do terceiro ciclo de seleção (Exp. 2).

Programa GENES INT. AO ACASO
Arquivo de dados : A:\exp2-c3-novo.dat
Número de variáveis : 1
Número de genótipos : 18

ANALISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL => % gigantes

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	17	2097,44171	123,378924	2,1736	,024813
RESÍDUO	36	2043,4615	56,762819		
TOTAL	53	4140,9032			
MÉDIA geral			8,30166666666667		
CV(%)			90,7541906648429		

PARÂMETROS GENÉTICOS - Obtidos para genótipos

VARIÂNCIA FENOTÍPICA (média)	43,595788
VARIÂNCIA AMBIENTAL (média)	20,057071
VARIÂNCIA GENOTÍPICA (média)	23,538717
HERDABILIDADE (US : média da família) - %	53,9931
CORRELAÇÃO INTRACLASSE (US : parcela) - %	29,3129
COEF. VARIAÇÃO GENÉTICO (%)	58,4421
RAZÃO CVg/CVe - Média dos genótipos	,644
NÚMERO MÉDIO DE REPETIÇÕES	2,8301

MÉDIAS DAS VARIÁVEIS

TRAT	REPET	%GIG
1 (A1)	1	4,8700 .
2 (B6)	1	3,4000 .
3 (C20)	1	3,4000 .
4 (D22)	2	4,6000 ± 1,79 *
5 (D40)	4	6,3500 ± 2,09
6 (D47)	1	16,6700 .
7 (G69)	3	8,7333 ± 3,56
8 (G76)	1	3,9300 .
9 (G78)	3	28,3100 ± 22,48
10 (E48)	13	8,5085 ± 8,09
11 (E50)	3	3,4433 ± 0,33
12 (E55)	4	2,5175 ± 1,13
13 (F61)	2	8,5000 ± 7,78
14 (H85)	1	14,8700 .
15 (J99)	1	28,0700 .
16 (J100)	5	6,6260 ± 3,45
17 (J104)	1	5,8700 .
18 (Q119)	7	5,7629 ± 3,86

TRAT=tratamentos; REPET=repetições;

%GIG= porcentagem de grãos gigantes;

*média ± desvio padrão;

- resultados sem desvio padrão (apenas uma observação).

APÊNDICE 25 – Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes e limites de comprimento e largura dos grãos de pólen ocorrentes nas plantas selecionadas no terceiro ciclo (Exp. 2).

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*
A1-6	50,65-49,69	47,3-53,75/47,3-51,6	65,64-58,91	60,2-73,1/58,05-62,35
B6-8	52,25-51,17	49,45-53,75/47,3-53,75	70,09-56,98	64,5-77,4/55,9-58,05
C20-4	48,31-47,15	45,15-51,6/45,15-49,45	62,78-60,91	60,2-66,65/58,05-64,5
D22-11	52,68-50,74	51,6-53,75/49,45-51,6	71,81-67,73	62,35-73,1/60,2-73,1
D22-13	53,04-52,46	47,3-53,75/47,3-53,75	62,65-59,73	62,35-64,5/58,05-64,5
D40-3	50,35-49,45	49,45-51,6/47,3-51,6	60,85-57,62	58,05-64,5/55,9-60,2
D40-9	46,29-44,57	43,0-51,6/43,0-49,45	64,07-61,49	62,35-68,8/60,2-66,65
D40-16	55,19-52,89	53,75-58,05/51,6-53,75	64,35-61,77	60,2-70,95/58,05-66,65
D40-18	49,45-48,01	45,15-51,6/43,0-49,45	64,76-62,65	60,2-68,8/60,2-64,5
D47-2	53,47-50,89	47,3-53,75/47,3-53,75	68,22-65,79	64,5-75,25/60,2-75,25
E48-11	51,60-50,42	49,45-53,75/47,3-53,75	63,21-60,91	60,2-66,65/58,05-64,5
E48-15	54,29-52,61	51,6-55,9/51,6-53,75	61,21-58,20	58,05-66,65/55,9-62,35
E48-16	53,17-52,18	49,45-53,75/49,45-53,75	67,73-65,79	66,65-73,1/62,35-73,1
E48-28	51,75-50,46	47,3-53,75/45,15-51,6	62,20-58,63	60,2-66,65/58,05-66,65
E48-33	54,46-52,18	47,3-55,9/47,3-55,9	70,80-60,48	62,35-77,4/58,05-64,5
E48-44	47,30-46,44	47,3-53,75/45,15-53,75	59,77-56,33	55,9-64,5/55,9-58,05
E48-47	54,03-52,46	49,45-55,9/47,3-55,9	70,09-65,64	64,5-73,1/60,2-73,1
E48-48	53,75-52,18	49,45-58,05/49,45-55,9	66,93-65,36	64,5-70,95/62,35-68,8
E48-52	50,03-48,59	43,0-53,75/43,0-51,6	64,78-62,78	62,35-75,25/60,2-75,25
E48-54	50,89-47,73	43,0-53,75/43,0-49,45	69,40-64,65	66,65-70,95/55,9-66,65
E48-69	53,32-50,37	47,3-53,75/45,15-53,75	59,13-57,62	55,9-64,5/55,9-64,5
E48-70	49,24-47,52	45,15-53,75/45,15-51,6	68,52-65,79	64,5-73,1/62,35-70,95
E48-73	51,39-50,10	49,45-53,75/47,3-53,75	62,57-59,99	60,2-68,8/55,9-64,5
E50-6	53,04-51,17	49,45-55,9/45,15-53,75	62,78-56,61	62,35-66,65/55,9-60,2
E50-17	53,54-52,03	51,6-55,9/51,6-53,75	65,36-62,78	60,2-75,25/58,05-70,95
E50-28	50,89-50,16	49,45-53,75/45,15-51,6	60,85-59,13	58,05-64,5/58,05-64,5

* as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

...continuação

APÊNDICE 25 – Tamanho médio dos grãos de pólen normais e gigantes e limites de comprimento e largura dos grãos de pólen ocorrentes nas plantas selecionadas no terceiro ciclo (Exp. 2).

Plantas selecionadas	Tamanho médio dos grãos normais (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*	Tamanho médio dos grãos gigantes (μm)*	Limites comprimento/largura (μm)*
E55-10	51,45-49,02	47,3-53,75/45,15-53,75	61,64-57,53	60,2-66,65/55,9-64,5
E55-13	51,75-50,16	47,3-55,9/47,3-53,75	62,35-59,06	58,05-66,65/58,05-64,5
E55-15	52,89-51,60	51,6-53,75/49,45-53,75	60,85-57,19	58,05-64,5/55,9-62,35
E55-31	52,76-51,60	49,45-53,75/49,45-53,75	61,77-58,20	60,2-70,95/55,9-60,2
E55-32	49,30-48,01	45,15-51,6/45,15-51,6	59,81-57,86	58,05-62,35/55,9-60,2
F61-14	50,03-48,74	47,3-51,6/45,15-51,6	64,50-59,06	64,5-66,65/58,05-64,5
F61-15	53,75-52,61	51,6-55,9/49,45-53,75	65,36-61,77	62,35-68,8/58,05-66,65
G69-3	51,17-49,02	49,45-53,75/45,15-51,6	67,66-61,64	64,5-73,1/58,05-64,5
G69-9	52,46-50,89	47,3-53,75/47,3-53,75	68,16-59,77	60,2-77,4/55,9-64,5
G69-24	55,19-52,46	47,3-60,2/43,0-58,05	72,09-68,22	64,5-77,4/64,5-75,25
G76-16	51,82-48,44	47,3-53,75/43,0-51,6	63,06-57,62	60,2-68,8/55,9-62,35
G78-2	56,76-53,32	53,75-58,05/51,6-55,9	62,22-60,20	58,05-68,8/55,9-62,35
G78-5	52,03-51,39	49,45-53,75/49,45-53,75	63,79-60,48	60,2-68,8/58,05-64,5
G78-15	50,16-48,44	47,3-53,75/45,15-51,6	61,64-56,27	58,05-66,65/55,9-60,2
H85-10	52,89-51,88	47,3-53,75/47,3-53,75	64,78-57,90	62,35-68,8/55,9-62,35
J99-14	59,34-56,05	55,9-62,35/51,6-58,05	70,24-66,37	64,5-73,1/64,5-68,8
J100-2	53,32-51,75	47,3-55,9/47,3-53,75	58,91-57,19	58,05-62,35/55,9-60,2
J100-30	50,46-48,16	47,3-53,75/45,15-51,6	61,64-57,19	58,05-66,65/55,9-58,05
J100-32	53,90-52,59	49,45-55,9/49,45-53,75	63,17-59,66	58,05-66,65/58,05-60,2
J100-35	53,47-50,59	51,6-55,9/47,3-53,75	63,06-53,75	62,35-68,8/51,6-62,35
J100-37	52,31-51,30	43,0-55,9/43,0-55,9	67,66-64,78	64,5-70,95/62,35-70,95
J104-4	49,45-48,74	45,15-51,6/45,15-51,6	60,48-59,62	58,05-64,5/58,05-64,5
Q119-7	51,60-48,59	47,3-53,75/45,15-51,6	64,78-59,34	60,2-70,95/58,05-64,5
Q119-9	50,74-49,02	49,45-53,75/49,45-53,75	64,22-58,91	62,35-66,65/58,05-66,65
Q119-11	48,27-49,06	49,45-53,75/45,15-51,6	69,66-62,52	64,5-77,4/60,2-70,95
Q119-14	51,88-49,82	47,3-55,9/43,0-51,6	60,20-57,19	55,9-64,5/55,9-62,35
Q119-17	51,45-50,46	47,3-53,75/47,3-53,75	62,07-56,48	58,05-66,65/55,9-58,05
Q119-24	55,04-51,75	49,45-55,9/49,45-51,6	63,36-57,34	60,2-66,65/55,9-60,2
Q119-28	52,89-50,03	49,45-55,9/47,3-53,75	70,09-59,62	64,5-77,4/58,05-64,5
Médias	52,05-50,35		64,54-60,31	

* as medidas foram feitas tomando o comprimento e a largura dos grãos de pólen, respectivamente;

APÊNDICE 26 – Cruzamentos recíprocos realizados no terceiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta mãe	Genitor(es) masculino(s)	Nº flores polinizadas	Nº sementes coletadas	% de flores polinizadas que produziram sementes
A1-6	E48-15	30	19	63,33
A1-6	E48-16	20	20	100
A1-6	E50-6	30	27	90
D22-13	J104-4	27	21	77,78
D40-3	J104-4	30	12	40
E48-11	J100-30	15	6	40
E48-11	G78-5	20	14	70
E48-11	E50-6	35	16	45,71
E48-15	J100-32	10	11	110
E48-16	E48-28	40	20	50
E48-28	J100-32	28	19	67,86
E48-28	J104-4	30	10	33,33
E48-28	Q119-17	30	5	16,67
E48-28	A1-6	35	23	65,71
E48-28	Q119-17	30	8	26,67
E48-44	G78-5	18	25	138,89
E48-44	E50-6	30	12	40
E48-69	E48-15	20	17	85
E48-69	E50-6	20	22	110
E48-69	G78-2	20	6	30
E48-70	E55-10	20	12	60
E48-70	G78-2	20	11	55
E50-6	E55-13	25	10	40
E50-6	E55-10	35	8	22,86
E50-6	E48-16	22	4	18,18
E50-6	Q119-9	23	9	39,13
E50-6	Q119-17	20	11	55
E50-6	Q119-17	35	16	45,71

...continuação

APÊNDICE 26 – Cruzamentos recíprocos realizados no terceiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta mãe	Genitor(es) masculino(s)	Nº flores polinizadas	Nº sementes coletadas	% de flores polinizadas que produziram sementes
E50-10	E48-15	20	15	75
E50-10	G78-2	20	16	80
E50-28	E48-28	26	11	42,31
E55-10	E48-28	40	34	85
E55-10	E50-6	30	18	60
E55-10	H85-10	30	9	30
E55-10	J104-4	15	11	73,33
E55-10	J100-32	25	13	52
E55-10	E50-6	30	22	73,33
E55-10	Q119-14	15	21	140
E55-10	Q119-17	25	20	80
E55-10	Q119-9	25	25	100
E55-10	E48-15	20	15	75
E55-13	E55-10	20	16	80
E55-13	J100-32	30	4	13,33
E55-13	F61-14	25	17	68
E55-13	E50-6	20	2	10
F61-5	G78-5	20	15	75
G69-9	J100-32	25	10	40
G69-9	E55-10	30	29	96,67
G69-24	F61-14	30	20	66,67
G78-2	E55-10	20	1	5
G78-5	E48-70	25	18	72
G78-5	E50-6	25	18	72
H85-10	J104-4	20	18	90
J100-2	Q119-17	25	20	80

...continuação

APÊNDICE 26 – Cruzamentos recíprocos realizados no terceiro ciclo de seleção do Experimento 2.

Planta mãe	Genitor(es) masculino(s)	Nº flores polinizadas	Nº sementes coletadas	% de flores polinizadas que produziram sementes
J100-30	H85-10	25	14	56
J100-30	E55-13	30	20	66,67
J100-32	E48-28	15	10	66,67
J100-32	E50-6	25	18	72
J100-32	E48-15,E50-6	25	16	64
J104-4	E48-11	25	18	72
J104-4	E50-6	20	19	95
J104-4	J100-30	12	16	133,33
J104-4	A1-6	30	20	66,67
J104-4	E50-6	30	19	63,33
J104-4	D40-6,Q119-9	30	0	0
J104-4	J100-32	25	16	64
J104-4	E55-10	35	14	40
Q119-9	E55-10	10	15	150
Q119-9	J100-32	28	23	82,14
Q119-9	J104-4	25	10	40
Q119-9	E55-10	21	15	71,43
Q119-9	E48-16	20	16	80
Q119-9	E50-6	25	25	100
Q119-14	J100-32	30	34	113,33
Q119-17	G78-5	30	18	60
Q119-17	E48-28	25	18	72
Q119-17	H85-10,J100-32	35	17	48,57
Q119-17	J104-4	25	0	0
Q119-17	J104-4	20	8	40
Q119-17	E48-11	15	10	66,67
Q119-17	J104-4	31	15	48,39
Q119-17	G78-15	25	9	36
Total		2046	1230	Média = 60,12

APÊNDICE 27 - Análise estatística para desempenho geral das famílias da variável frequência de produção de grãos de pólen gigantes nos três ciclos de seleção.

 * SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA *
 * Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado *
 * Departamento de Estatística - UFRGS *
 * ANALISE DA VARIÁVEL GRAOSGIG - ARQUIVO: CARINE2 *

CODIGO DO PROJETO: MELHOR

RESPONSÁVEL: CARINE

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: DCC

OBSERVAÇÕES NÃO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

 FATOR NOME

 A FAMILIA
 B CICLO

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
FAMILIA	2	3014.5675624	1507.2837812	67.1831	0.00001
CICLO	2	633.0145402	316.5072701	14.1075	0.00003
FAM*CIC	4	1390.7613159	347.6903290	15.4974	0.00001
RESIDUO	143	3208.2685993	22.4354448		
TOTAL	151	8246.6120178			

MEDIA GERAL = 6.509540

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 72.764%

VITA

Carine Simioni, filha de Sérgio Luiz Simioni e Cirja Júlia Toazza Simioni, nasceu no dia 26 de abril de 1970, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Completo o primeiro grau na Escola da Imaculada, em Canoas, RS, e cursou o segundo grau na Escola Estadual de 2º grau Cândido José de Godói, localizado em Porto Alegre, RS.

Concluiu o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas em 1993, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Em 1996, concluiu o Mestardo em Zootecnia, área de concentração Plantas Forrageiras, do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS).

De 1996 a 1999, lecionou Ciências na Escola Municipal de Ensino Fundamental Professor Thiago Wüirth e Escola Municipal de Ensino Fundamental Farroupilha, ambas localizadas em Canoas, RS, e na Escola Municipal de Ensino Fundamental Santa Ana, localizada em Gravataí, RS.

Ingressou no Curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração Plantas Forrageiras, do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em março de 2000.